

Title	タンパク固定化カラムを用いる血中光学異性体薬物の分析に関する研究(Dissertation_全文)
Author(s)	小田, 吉哉
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1993-07-23
URL	http://dx.doi.org/10.11501/3070379
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author

②

タンパク固定化カラムを用いる
血中光学異性体薬物の分析に関する研究

小 田 吉 哉

目次

緒言	3
第1章 カラムスイッチングシステムの開発	
第1節 HPLCを用いた従来の光学分割とその限界	7
第2節 希釈管と濃縮カラムを組み込んだ移動相変換システムの開発	10
第3節 小口径カラムによる感度向上の検討	18
第2章 カラムスイッチングシステムによる血中光学異性体薬物の分析	
第1節 酸性薬物ケトプロフェンの分析	
1-1 ODSカラムのよる血中ケトプロフェンの定量	22
1-2 オボムコイドカラムによる光学分割の検討	25
1-3 カラムスイッチングによるオンライン分析	28
第2節 塩基性薬物ベラパミルの分析	
2-1 血中のベラパミルとその代謝物の定量	30
2-2 オボムコイドカラムによる光学分割の検討	33
2-3 オンライン化によるベラパミルとその代謝物の一斉分析	38
第3章 血清試料直接注入可能なアビジンカラムの開発	
第1節 前処理なしの血清中薬物分析とアビジンカラムの合成について	42
第2節 血清試料直接注入の検討	46
第3節 スペーサーの検討	47

第4節 血清試料直接注入による光学異性体の分析	5 1
第4章 アビジンカラムとオボムコイドカラムの保持挙動の比較	5 4
第1節 移動相のpHの影響	5 5
第2節 移動相中の有機溶媒の影響	5 7
第3節 移動相中の塩の影響	5 9
第4節 カラムの耐久性とアビジン-ビオチン複合体について	6 1
第5章 アビジンカラムを用いたカラムスイッチングシステムの検討	
第1節 オボムコイドカラムとの組み合わせ	
1-1 アビジンカラムへの血清試料直接注入による分離定量	6 5
1-2 オンライン化によるオボムコイドカラムでの光学分割	6 9
第2節 質量分析装置との連結 (LC/MS)	
2-1 アビジンカラムによる光学分割の検討	7 3
2-2 アビジンカラムによるE2020の血清直接注入分析	7 7
2-3 アビジンカラムと質量分析装置との連結 (LC/MS)	8 0
実験材料の部	8 8
結論	9 1
謝辞	9 4
参考文献	9 5

緒言

19世紀にPasteurが(+)アスパラギンが甘く、(-)アスパラギンにはほとんど味がないことに気付いて以来、生物は容易に光学異性体を識別し得ることがわかった。また、生体構成物質の多くは不斉中心を有すること、例えば生体内のアミノ酸はL体のみであり、糖類はD体のみであることから光学活性体が生体の機能と重要な関係を有していることが強く認識されるようになった。今日、市場に流通している医薬品の約半分はその骨格に不斉中心を有すると言われている¹⁾。S体のみに催奇形性があることが後に分かったサリドマイドの例のように、不斉中心を有する薬物やその代謝物は光学異性体間で薬効や毒性が異なることがある^{2)・8)}。これは光学異性体間で代謝速度や代謝経路が異なり^{9)・10)}、あるいはレセプターへの親和性が異なるためであると考えられる。

最近いくつかの光学異性体薬物間の体内動態挙動の違いが明らかにされているが、一方の光学異性体薬物の体内挙動から他方のそれを予測することは極めて難しい¹¹⁾。さらに、不斉合成や光学異性体の分離・精製の技術は近年大きく進歩しているものの、現実にはラセミ体としてあるいは光学不純物を含む薬物が開発されている例も多く見られる。しかし生物活性が本来の目的である医薬品の研究においては、光学異性体の取り扱いを避けて通ることのできない課題である。一方、1992年5月米国FDAより立体異性体に関する品質管理の指針が発表され、光学異性体薬物の規制に対して国際的関心が急激に高まっている。従って、光学異性体を有する医薬品を開発し、使用するためには体内動態研究や品質管理などのあらゆる部門で光学異性体の分離分析が不可欠である¹²⁾。

光学異性体を分離・精製する方法として分別結晶化法や酵素反応法、包接化合物生成法などがあるが、これらは適用範囲が限定され、分離能や定量性が悪いので、一般にクロマトグラフィーが汎用されている¹³⁾。特に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法による光学分割は進歩が著しく^{14)・15)}、分取精製や純度検定、血中濃度測定などに広く用いられている。HPLCによる光学分割法は直接法と間接法に大別される¹⁶⁾

¹⁸⁾。直接法は、光学認識物質を移動相または固定相として用いることにより光学異性体を直接分離する方法である¹⁹⁻²²⁾。一方、間接法は、光学活性な試薬を用いて目的の化合物をあらかじめジアステレオマーに誘導体化した後に、通常の移動相および固定相を用いて分割する方法である。それぞれの特徴を以下に述べる。

直接法：1) 目的の化合物が、移動相に添加した光学認識試薬あるいは光学活性な固定相との間に選択的相互作用を起こすことが必要である。

2) 光学活性固定相や移動相添加剤の選択などの分離条件の最適化が容易ではない。

3) 市販の光学活性固定相の多くは順相モードで使用される。そのため低波長での紫外吸光検出が難しく、また水分の混入によって分離が低下するので生体成分分析への応用は容易ではない。

4) 検出感度は目的薬物の性質（吸光係数など）に依存する。

間接法：1) 目的の化合物が誘導体化反応に適した官能基例えばカルボキシル基やアミノ基、水酸基などを有している必要がある。

2) 誘導体化試薬は光学純度が高く、保存中にラセミ化を起こさない。

3) 誘導体化反応はそれぞれの光学異性体に対し同じ速度で進行しなければならない。

4) 誘導体化反応中に分解あるいはラセミ化を起こさない。

5) 誘導体化により高感度検出や選択的検出が可能となる。

6) ジアステレオマーの分離は比較的容易であるため、例えば生体成分など夾雑物からの分離も同時に検討可能である。

このようにそれぞれ利点欠点を有するものの、測定の迅速性・簡便性の観点から直接法による分析、特に光学活性な固定相（CSPs）が用いられることが多い²³⁾。CSPsによる分離機構について、1952年Dalglish²⁴⁾により三点支持理論が提唱された。それによると固定相分子と少なくとも一方の光学異性体分子との間に、疎水結合やイオン結合、水素結合、 $\pi-\pi$ 相互作用、ファンデルワールス力などの相互作用や立体障害

²⁵⁾が働き、可逆的なジアステレオマー複合体を形成する。この複合体の熱力学的安定性の違いがHPLCでの保持力の違いとなり光学異性体が分離できると考えられている²⁶⁾。1971年にDavankovとRogozhin²⁷⁾が銅などの金属イオンを利用した配位子交換クロマトグラフィーを発表し、直接分割法の探索が行なわれるようになった。さらに1980年Pirkleら²⁸⁾が光学活性なフェニルグリシン誘導体を固定相として用いた。その後セルロース^{29, 30)}や合成ポリマー³¹⁾、タンパク³²⁻³⁴⁾、クラウンエーテル誘導体³⁵⁾、シクロデキストリン³⁶⁾およびその誘導体などを担体に結合させたさまざまなCSPsが開発された³⁷⁾。

ところで三点支持理論において重要な役割を果たす水素結合は、一般に水の存在下では弱められるので、市販されている多くの光学分割用カラムの分離モードは非水系移動相を用いる順相系である。順相モードでは痕跡程度の水分が混入してもCSPsの分離能が低下すると言われている³⁸⁾。原薬の品質管理で使われるHPLC分析では順相系、逆相系どちらも採用できる場合もあるが、生体試料中の光学異性体薬物分析においては、試料中に水分や高極性物質を多く含むため順相モードより逆相モードでの分析が望まれる。さらに生体試料中に微量に含まれる薬物の分析には高感度化が必要である。しかし順相系に用いられる移動相は、一般に紫外線低波長部分に吸収を有し、また電気化学検出器の使用もできないなどの不利がある。一方、初めに述べたように生体内には多様な不斉分子が含まれ、その結果酵素やレセプター、細胞膜などは一般に立体異性体を識別する能力を持っている。従ってCSPsとして天然物質であるタンパクを固定化したカラムを使用することは興味深く、生体試料中の薬物分析に有利とされる水系の移動相が使用でき、また一種類のカラムを広範な薬物に適用できることから最近注目が集まっている³⁹⁾。

このようにHPLCによる光学分割は近年大きく進歩したが、報告されている分析例の多くは標準試料の光学分割であり、生体試料中の光学異性体薬物への応用例は限られている。なぜなら既に述べたように、ほとんどのCSPsでは使用できる移動相に制約があり、タンパク固定化カラムでは水系移動相が使用できるとはいうものの分離効率

第一節 HPLCを用いた従来の光学分割とその限界

生体試料中の光学異性体の分析法として、主にバイオアッセイ法とHPLC法が用いられている。まず生体が有する不斉識別能に着目したバイオアッセイ法は、目的の物質に対する生物反応として光学異性体を特異的に検出できる手法である。しかしバイオアッセイを行うためには、例えば生体中の夾雑物質が目的薬物由来の生物反応を阻害あるいは増強してはならないこと、また抗原抗体反応を利用したイムノアッセイでは代謝物などと交差反応がないことが必要である。このような理由から、多くの場合バイオアッセイ法の適用には、試料をあらかじめ十分に精製するという煩雑さを伴う。

一方HPLC法による光学異性体分析の多くは順相モードであり⁴⁴⁾、薬物を分離定量するためには、水などの極性物質の多い生体試料から目的の薬物をn-ヘキサンやクロロホルムなどの低極性溶媒に抽出する必要がある⁴⁵⁾。しかし薬物自身の極性が高い場合や生体成分の除去が難しい場合もあり生体試料への応用は容易ではない。このような順相系のカラムに比べてタンパクを固定化したカラムは水系移動相が使用できるので生体試料中の薬物分析に適している。1987年三輪らは、鶏の卵白中に含まれる安定な酸性糖タンパクであるオボムコイドが光学認識能を有することを見だし、このオボムコイドをシリカゲルに固定化したHPLC用OVMカラムを開発した³⁴⁾。OVMカラム上での保持挙動は移動相のpHや有機溶媒、塩などに大きく影響されるが、適当な移動相条件を設定することによって種々の光学異性体薬物の分離に成功している⁴⁶⁻⁴⁸⁾。これに伴って、OVMカラムの有用性は広く知られるようになったが、分析例のほとんどは生体物質など複雑な成分を含まない合成標品の分離に限られている。これはOVMカラムだけでは生体成分や代謝物との分離を行ない、同時に光学分離も可能な条件を見いだすことが極めて難しいためである。

一方、カラムの分離効率を高める手法としてカラムスイッチング法が知られている

が低い、つまり従来のCSPsでは光学分割と共存物との分離とを同時に可能とする条件を設定することは極めて困難であったからである。

このような背景にあって、筆者は生体試料特に血中の光学異性体薬物分析を目的としてタンパク固定化カラムを用いるHPLCシステムを開発した。先ずオクタデシルシリル化シリカゲル充填(ODS)カラムと卵白中の糖タンパクの一つであるオボムコイドを固定化したオボムコイド(OVM)カラムのオンライン化を検討した。現在ODSカラムは低分子薬物の分離定量に最も多く使われている。一方OVMカラムは、様々な光学異性体を分離でき⁴⁰⁻⁴²⁾安定性にも優れている⁴³⁾。ところが移動相条件がこの二つのカラム間で大きく異なるため従来のカラムスイッチング法を適用することは困難であった。そこで筆者は希釈管と濃縮カラムを導入する方法を考案し、新しいカラムスイッチング法の開発に成功した。さらに小口径OVMカラムをこのシステムに用いることによって高感度化を図った。次に血清試料の前処理操作を簡便化・迅速化するために、卵白中の糖タンパクの一つであるアビジンを固定化したアビジンカラムによる血清試料直接注入分析法を開発した。またこのアビジンカラムは光学分割能も同時に有するので、その保持や分離挙動についてOVMカラムとの比較を行った。最後により多くの血中光学異性体薬物に応用できるようにアビジンカラムとOVMカラムのオンライン化や、より選択性を高めるためにアビジンカラムを用いたHPLCと質量分析装置(MS)とを連結したLC/MSによる分析法を開発した。

以下、5章にわたりこれらの結果について論述する。

⁴⁹⁾。これは複数の異なった分離機構を持つカラムを組み合わせる方法である。つまり、あるカラムから溶出した目的の化合物を別のカラムに移し、そこで再び分離を行なう。一般にスイッチングバルブを介して複数のカラムをオンライン化している。

1988年、Wainerらは血中光学異性体薬物の分離定量を行なうためのカラムスイッチング法を開発した^{50, 51)}。彼らの方法では、まず光学不活性なカラムにより生体試料中の目的の薬物を分離定量して、次に目的画分のみをオンラインで光学活性なカラムに導入して光学分割を行なっている。その後さらにこの方法の応用例も報告されている^{52, 53)}。これらの報告では、光学活性なカラムとして、水系移動相が使用可能である牛血清アルブミンや α_1 -酸性糖タンパクなどを固定化したカラムを用いて光学分割を行ない、また光学不活性なカラムとして、比較的疎水性の弱いフェニルカラムや内面逆相シリカカラム（いわゆるピンカートンカラム）⁵⁴⁾などを使用して分離定量を行なっている。一方、現在ODSカラムは、低分子薬物の分離分析に汎用されている⁵⁵⁾が、目的の薬物と生体成分や代謝物との分離定量を行ない、その後カラムスイッチング法を用いて光学分割を行なった報告はない。

光学不活性カラムと光学活性カラムを用いた従来のカラムスイッチングシステムを図1に示した。まず試料をインジェクターから注入し光学不活性カラムにより夾雑物から目的の薬物を分離して検出器1で定量する。このとき目的のピークが検出されると同時にバルブを切り替え（実線→点線）、目的の薬物を移動相1により光学活性カラムに送りこむ。光学不活性カラムからこの薬物の溶出が完了次第バルブを元に戻す（点線→実線）。目的の薬物は移動相2により光学活性カラムで光学分割される。ここで目的の薬物を光学活性カラムに送り込んでいる間（バルブを実線から点線に切り換えている間）、移動相1が光学活性カラムに直接流れ込む。よって光学活性カラムが移動相1の影響を強く受ける。特に移動相1と移動相2の溶媒組成（pH、有機溶媒、塩など）が大きく異なるほど、光学活性カラムでの分離に支障を来す。ところがODSカラムでは、疎水的保持の強いので移動相中の有機溶媒の割合を多くする必要があるのに対して、タンパク固定化カラムでは溶出に必要な有機溶媒の割合は少なく、また移動相中のpHの

影響を大きく受ける⁵⁶⁻⁶⁴⁾。つまり従来のカラムスイッチング法を適用するためには、移動相1と移動相2の組成の違いが小さくなるように考慮する必要がある⁶⁵⁾。

生体試料中のより多くの光学異性体薬物の分析を可能にするためには、使用できる移動相やカラムの選択の幅を広げる必要がある。そこで著者は、ODSカラムにおいて生体成分や代謝物から目的の薬物を分離定量して、次にOVMカラムで光学異性体を分離するカラムスイッチング法を検討した。

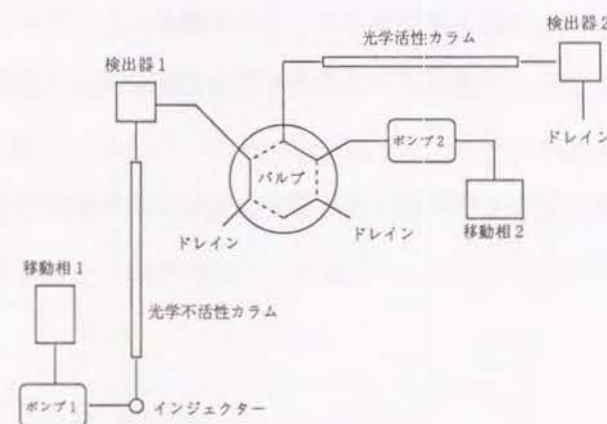


図1 従来のカラムスイッチングシステム

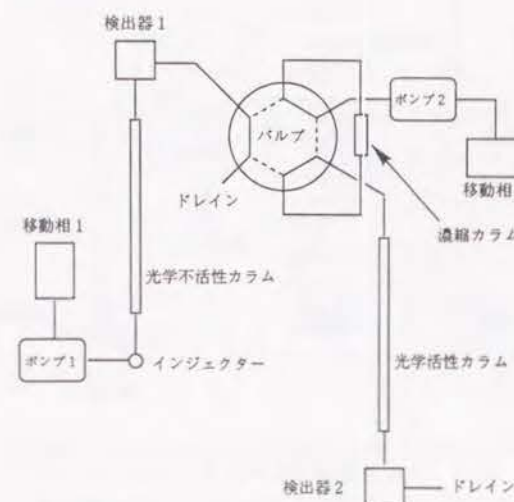


図2 改良を試みたカラムスイッチングシステム ～濃縮カラムの導入～

第2節 希釈管と濃縮カラムを組み込んだ移動相変換システムの開発

従来のカラムスイッチングシステム（図1）の欠点は、移動相1が直接次のカラムへ流れ込むことにある。そこでまず移動相1による光学活性カラムへの影響を少なくするために、光学不活性カラムからの溶出した目的の薬物を濃縮カラムに保持させた後、移動相2により目的の薬物を光学活性カラムに送り込み光学分割を行うことを試みた

（図2）。濃縮カラムとして長さ10mm・内径4mmのODSカラムあるいはOVMカラムを用いた。しかし光学不活性カラム（ODSカラム）に使用している移動相1の溶出力が強いので、どちらの濃縮カラムを用いても目的の薬物を濃縮カラムに保持させることができなかった。

次に濃縮カラムに対する移動相1の影響が小さくなるように図3に示すシステムを組み上げた。

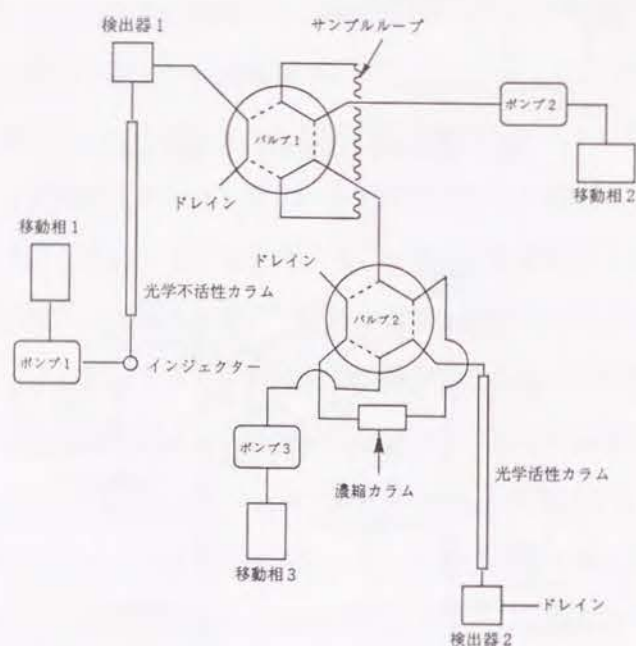


図3 改良を試みたカラムスイッチングシステム3
～濃縮カラムとサンプルループの導入～

まず光学不活性カラムから溶出した目的の薬物を、予め移動相2（濃縮カラムに目的の薬物を保持させることができる移動相）で満たされたサンプルループに取り込む（バルブ1：実線→点線）。次にこのループ内の薬物を濃縮するためにバルブ1を元の位置に戻し（点線→実線）、移動相2により薬物を濃縮カラムに送り込む。最後にバルブ2を切り換えて（実線→点線）、移動相3により薬物を光学活性カラムに送り込む。ここで濃縮カラムとして長さ10mm・内径4mmのODSカラムを用いた場合、濃縮カラムに保持された薬物を移動相3（光学活性カラムでの分析に適した移動相）により光学活性カラムに送り込むことはできなかった。これはODSカラムに対して移動相3の溶出力が弱いためである。次に濃縮カラムとして長さ10mm・内径4mmのOVMカラムを用いた場合、濃縮カラムに目的の薬物を確実に保持させることはできなかった。これは図4に示すように目的の薬物が濃縮カラムに到達するまでに移動相1と移動相2との混合が不十分であり、その結果濃縮カラムは溶出力の強い移動相1の影響を受けたためであった。

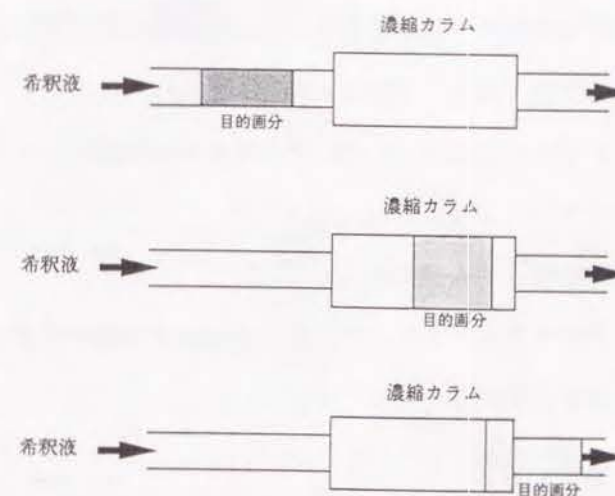


図4 濃縮カラムにおける目的化合物の不完全吸着の模式図

光学不活性カラムから溶出した目的の薬物を濃縮カラムに確実に保持させるためには、この画分を移動相2と効率よく混合し、移動相1の影響をできるだけ小さくする必要がある。そこで図5に示すような希釈管をこのシステムに導入した。移動相2は希釈管によりその流れが二方向（サンプルループ側と希釈管側）に分枝されて、濃縮カラムの手前で再び合流する。この希釈効果の模式図を図6に示した。サンプルループに取り込まれた目的の薬物は移動相2により押し出される。濃縮カラムの手前でこの画分は希釈管より供給される移動相2によって適当に希釈されながら濃縮カラムに送られて、目的の薬物は濃縮カラムに保持される。ここでこの希釈率は希釈管の抵抗、具体的には配管の長さや内径を変えることによって、サンプルループと希釈管を流れる移動相2の割合を任意に変えることが可能である。また移動相2は、目的の薬物が濃縮カラムに確実に保持できるような組成である必要がある。

次にこの新しいカラムスイッチング法（図5）の実例を以下に示す。

[HPLC条件]

光学不活性カラム：ODSカラム（長さ150mm x 内径4.6mm）

光学活性カラム：OVMカラム（長さ150mm x 内径4.6mm）

濃縮カラム：OVMカラム（長さ10mm x 内径4mm）

移動相1：アセトニトリル／5mM1-ベンタンスルホン酸ナトリウムを含むリン酸緩衝液＝30／70（v／v）、（pH3）

移動相2：5mMリン酸カリウム緩衝液（pH7）

移動相3：テトラヒドロフラン／エタノール／20mMリン酸カリウム緩衝液（pH4.8）＝1／8／91（v／v）

ポンプ1：流速1.0ml/min

ポンプ2：流速4.0ml/min

ポンプ3：流速1.0ml/min

検出波長：検出器1および2ともに230nm

試料：カルシウムチャンネルブロッカーである塩酸ベラパミル（VA）のラセミ体

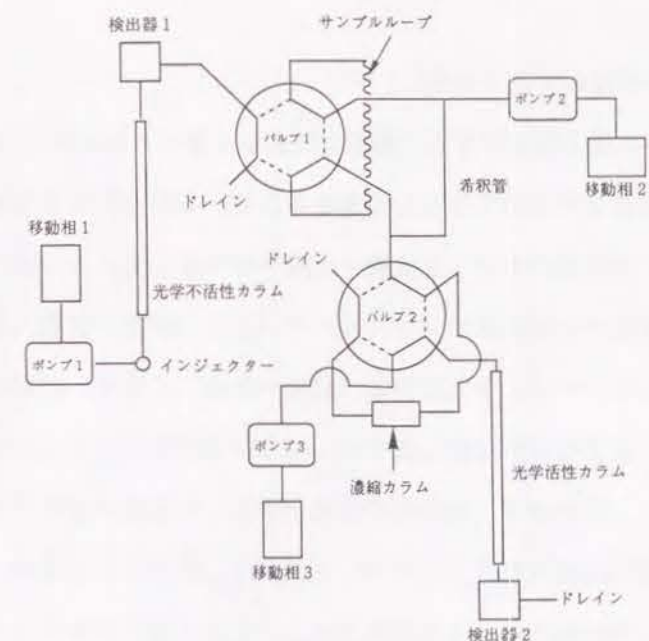


図5 著者の開発したカラムスイッチングシステム
～濃縮カラムと希釈管およびサンプルループの導入～

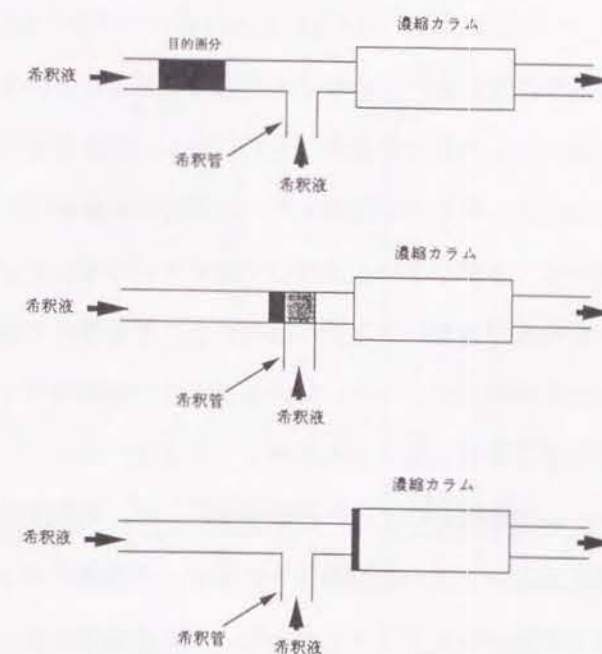


図6 濃縮カラムにおける希釈管導入による効果の模式図

[カラムスイッチング操作 (図5 参照)]

インジェクターから注入されたVA (構造式は図2 1 参照) はODSカラムで共存物質から分離され検出器1でラセミ体として定量される。ここで検出器1でVAのピークが検出され始めると同時にバルブ1を実線→点線へ切り換える。この操作によりVAを含むODSカラムからの溶出液はサンプルループ (2 ml 容量) に取り込まれる。VAの溶出が終了したときバルブ1を元の位置 (点線→実線) に戻す。移動相2によりサンプルループ中のVAを含む画分は押し出され、さらに希釈管とのジョイント部分でも移動相2と混ざりあう。その結果、移動相の極性が増加して溶出力が低下するので、VAは濃縮カラムの先端で保持される。バルブ1を元に戻してから5分後に、バルブ2を実線→点線へ切り換え移動相3により濃縮カラム上のVAはOVMカラムへ送られ、そこで光学分割され検出器2で光学異性体の比が求められる。

[希釈効果]

希釈倍率を変えたときの効果について検討を行い、検出器2におけるクロマトグラムを図7に示す。希釈なしのときは (C) のようにVAのピークが全く検出できなかった。これは移動相1の有機溶媒濃度が高いためにVAが濃縮カラムに保持されなかったためである。希釈倍率を4倍にしたときの結果を (B) に示す。移動相2により移動相1の影響が小さくなったことによってVAが濃縮カラムに保持され始めている。しかしまだ保持が完全ではないのでピークが小さい。またOVMカラムで後から溶出する (保持の強い) d-VAのピークの方が大きいことから濃縮カラムでも僅かではあるがVAに対し不斉を識別していることが伺える。(A) に示したように希釈率を10倍にすることによってピークは充分大きくなり、d : l の比が1 : 1 となった。

次に濃縮カラムにおける移動相1のpHの影響を検討した。希釈倍率を10倍に固定して、移動相2のpHを変えたときの結果を図8に示す。移動相2のpHが高くなるにつれてVAが濃縮カラムに保持されるようになった。これは濃縮カラムが移動相1のpHの影響を受けるので、移動相2により移動相1のpHの影響を小さくする必要がある。

これらの結果から希釈管が薬物の *in-line* 濃縮の効率化に大きな役割を果た

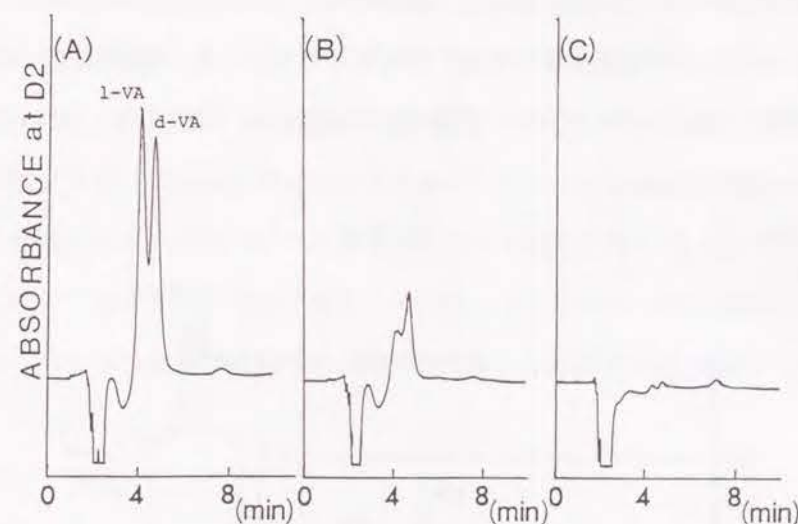


図7 希釈倍率の効果について
(A) 10倍希釈、(B) 4倍希釈、(C) 希釈なし

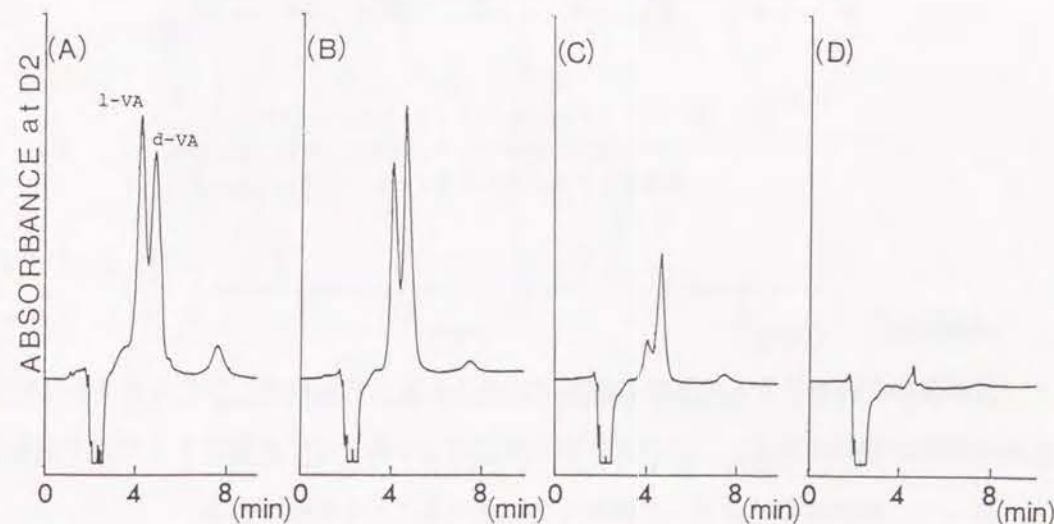


図8 希釈液 (移動相2) のpH効果について
(A) pH 7.5、(B) pH 7.2、(C) pH 6.9、(D) pH 6.5

していることが証明された。具体例として標準試料（VA及び内部標準パラアミノ安息香酸プロピルのみを含む生理食塩水溶液）によるODSカラム（検出器1）でのクロマトグラム（下線）とカラムスイッチング後のOVMカラム（検出器2）でのクロマトグラム（上線）を図9に示す。

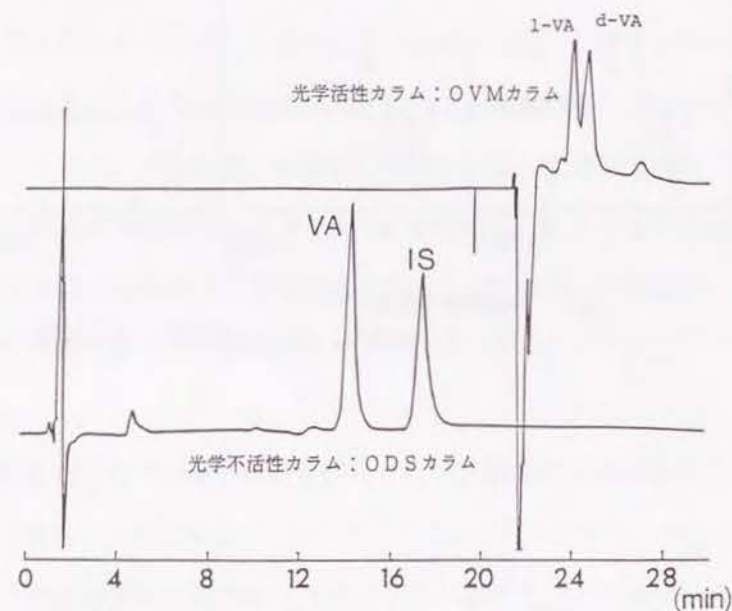


図9 図6のシステムにより得られたクロマトグラム
下線：ODSカラムでのクロマトグラム（検出器1）
上線：OVMカラムでのクロマトグラム（検出器2）

[濃縮効果]

目的薬物が濃縮カラムの先端に確実に保持されるのであれば、ODSカラムに同じ試料を複数回続けて注入し、その度に同じ溶出画分を繰り返し濃縮カラムに送り込むことによって、検出器2でのピーク強度を向上させることも可能である。

そこでまず移動相2の流速を1～6 ml/minまで、あるいは濃縮時間を5～60分まで変えたが、OVMカラムでのVAのピーク面積や光学分割能に変化はなかった。即ち濃縮カラム上でVAは拡散することなく確実に保持された。図10（A）は1 ng

／mlのVA 10 μ lをODSカラムに注入し、上記のカラムスイッチング操作によりOVMカラムで光学分割したときの例である。図10（B）は1 ng／mlのVAを10 μ lずつ5回ODSカラムへ注入し、そのつどVAを含む画分を濃縮カラムに送り、5回目の濃縮が終了した時点で濃縮カラムからOVMカラムに送り出して光学分割を行った例である。（A）に比べピーク高さが約3～4倍に大きくなったので、このような濃縮操作による高感度化が可能であり、特にODSカラムに一度に試料を大量注入することによってピーク形状が劣化して分離が損なわれる恐れのある場合などに有用な手法である。

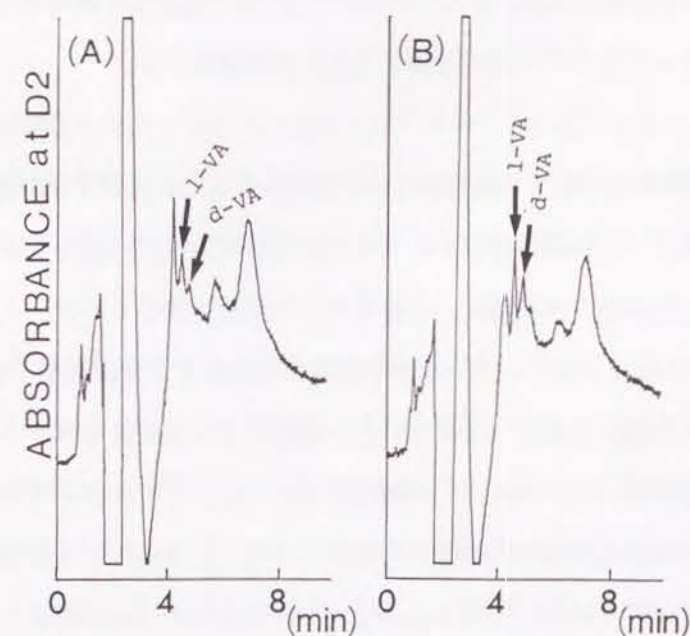


図10 濃縮カラムによる濃縮効果について検出器2で得られたクロマトグラム
（A）1 ng/mlのVAを10 μ l注入
（B）1 ng/mlのVA 10 μ lずつ繰り返し5回注入

第3節 小口径カラムによる感度向上の検討

生体試料中の薬物は、一般に体外へ排泄されるので投与後の時間経過と共にその濃度が低下する。また極く微量で効果の得られる薬物は投与量も少ないので血中濃度も低いレベルにあり、その体内動態研究では高感度な分析法が求められている。

小口径カラム（内径0.5～2 mm）を用いたHPLC（以下マイクロLC）は、使用する移動相や固定相の量を少なくすることができる。また通常のHPLC（内径4～8 mm程度）よりもカラム軸に対し垂直方向の拡散が少ないことから、検出の際ピークレスポンスが大きくなる（質量感度が向上する）⁶⁶⁻⁶⁹⁾。しかし同時に、試料の注入溶媒量も少なくする必要がある。よってマイクロLCにより高感度分析を行なうためには、試料を小口径カラムに注入する前に濃縮することが要求される。

1978年、Ishiiら⁷⁰⁾はオフライン法によるプレカラム濃縮法を考案した。これは小口径プレカラム（固定相はODS）に試料を注入し、適当な移動相により洗浄・濃縮を行なった後に、この小口径プレカラムを分離分析用の小口径カラムに直結する方法である。しかし操作性や分析時間、自動化の点で問題を残していた。

1984年、Apffelら⁷¹⁾は低溶出力の移動相により試料を小口径カラムの先端に一度保持・濃縮した後に、溶出力の高い移動相により試料をカラムから溶出させるグラジェント法を用いたオンカラム濃縮法を発表した。ところがマイクロLCは低流速であるので試料のカラム先端への濃縮に時間がかかり、また生体からの抽出物の分析では夾雑物質が直接分析カラムに流入するのでカラムの寿命を短縮するなどの欠点がある⁷²⁾。

1985年には、Ishiiらのグループ⁷³⁾とNielenらのグループ^{74, 75)}が、それぞれカラムスイッチング法を利用したオンライン法によるプレカラム濃縮法を開発した。図11に彼らのシステムを示した。インジェクターより注入された試料は移動相1により濃縮カラムに送られる。ここで濃縮カラムの長さは短い（1 cm以下）ので、カラム圧が低く移動相1の流速を上げることによって濃縮時間を短縮できる。次に

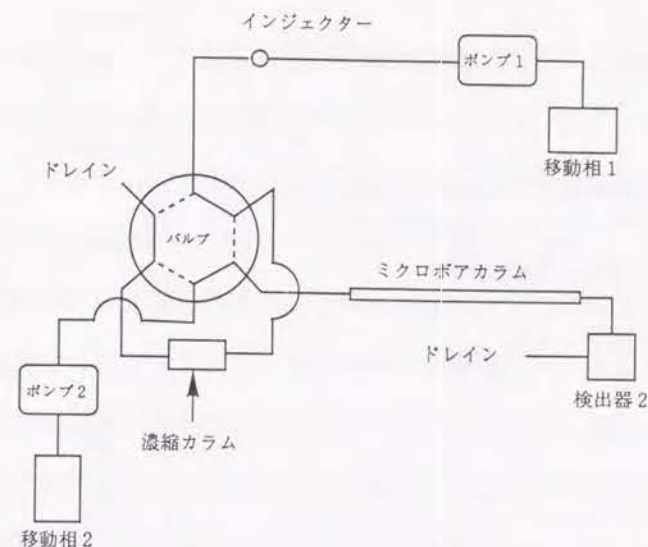


図11 プレカラム濃縮法を利用したマイクロボアカラムによる分析システム

濃縮カラムに対し保持の弱い夾雑物質を洗浄した後に、バルブを実線→点線に切り換えて移動相2により目的の薬物を濃縮カラムから小口径カラムに送り込み分離定量を行なう。

そこで著者の開発したカラムスイッチングシステム（図5）に小口径の光学活性カラム^{76, 77)}を組み込むことを検討した。このシステムでは既に濃縮カラムを用いているので、小口径カラムへの注入溶媒量の制限を大幅に改善することが可能である。図5のシステムに濃縮カラムとして長さ10 mm、内径4 mmのOVMカラムと光学活性カラムとして小口径OVM（以下マイクロOVM）カラムを使用した時の光学分離例を図12に示す。モデル化合物として抗不整脈剤であるフレカイニドを用いて、光学活性カラムの内径と移動相3の流速以外は同一のHPLC条件とした（詳細は第5章第1節参照）。図12においてマイクロOVMの内径と流速を；（A）4.6 mm、1.0 ml/min；（B）2.1 mm、0.3 ml/min；（C）1.0 mm、0.1 ml/minである。それぞれ同じ注入量（ラセミ体として100 ng）にも関わらず内径が小さくなるにつれてピークレスポンスが大きくなっており、（C）では（A）に比べてピーク高さ

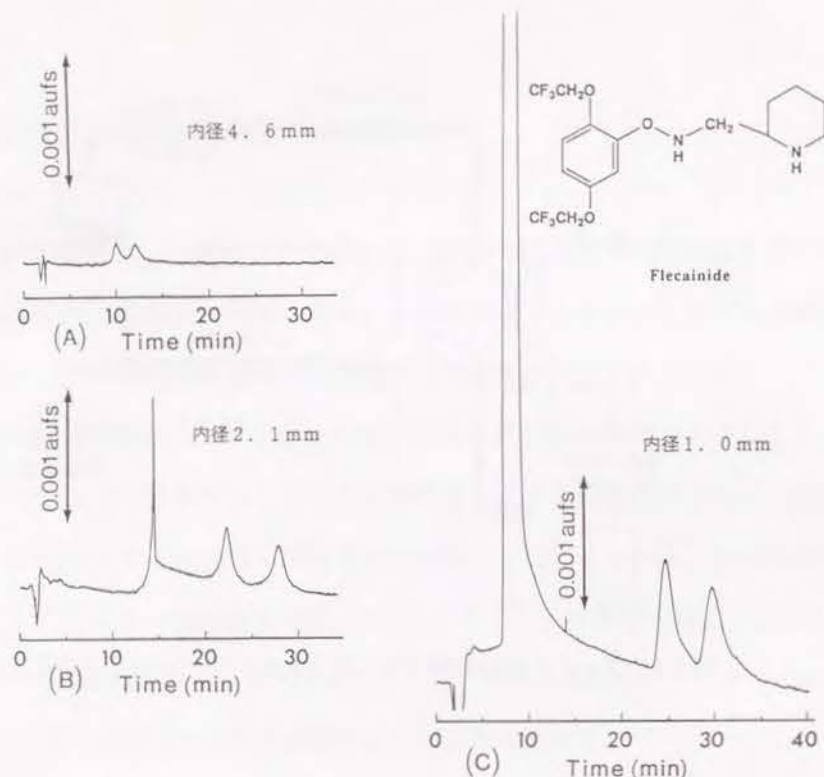


図12 ミクロOVM（長さ150mm）の使用により得られたクロマトグラム
～ラセミ体として100ngのフレカイニドを注入した～
(A) 内径4.6mm、(B) 内径2.1mm、(C) 内径1.0mm

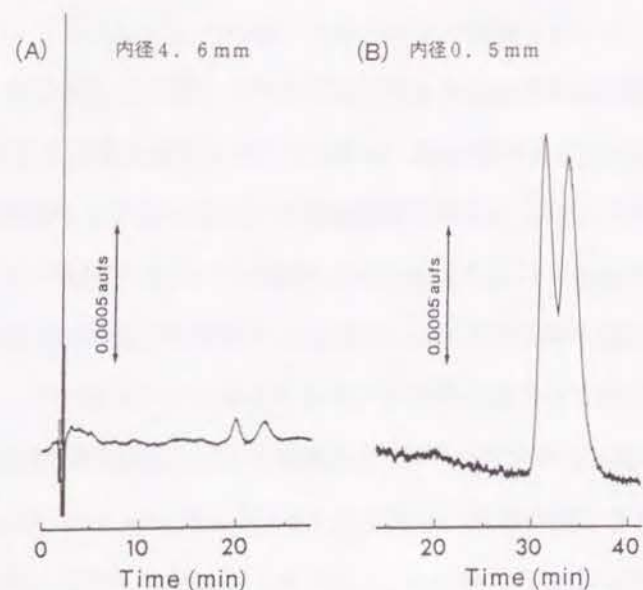


図13 ミクロOVMカラム（長さ150mm）によるケトプロフェンの光学分割
～注入量はラセミ体として4ng～
(A) 内径4.6mm、(B) 内径0.5mm

は約5倍になった。フレカイニドの光学分割の分離係数は、内径1.0mmのミクロOVMカラム並びに内径4.6mmの通常のOVMカラムともに、約1.2と同じであった。このように本システムにおいてミクロOVMカラムの使用は光学異性体の高感度分析に有用であることが示された。

次に、さらに高感度化を目指し内径0.5mm、長さ150mmのミクロOVMカラムについて検討を行なった。ミクロOVMカラムでの流速は $20\mu\text{l}/\text{min}$ と極く低流量であるので、検出器2（図5参照）のセル内における試料の拡散の影響を抑えるため、セル容量を通常使用の $8\mu\text{l}$ から $2\mu\text{l}$ に減らした。モデル化合物として非ステロイド系抗炎症薬であるケトプロフェンを使用した結果を図13（B）に示す。図13（A）は内径4.6mm、流速 $1.0\text{ml}/\text{min}$ 、セル容量 $8\mu\text{l}$ の通常のHPLC条件で得られたクロマトグラムである（その他のHPLC条件の詳細は第2章第2節参照）。ピーク高さは（A）に比べて（B）では約15倍となり、高感度化が可能であった。しかし、光学異性体の分離係数は1.2から1.1に低下した。また、このミクロOVMカラムは耐久性に乏しく、このカラムの製造技術がまだ発展途上にあることも考慮すると現段階では日常的分析に応用することは難しかった。しかし、本システムにミクロOVMカラムを使用することは、光学異性体の高感度分析に有用であり、今後カラム性能や耐久性を向上させることによって、体内動態研究に貢献できるものと期待される。

第2章 カラムスイッチングシステムによる血中光学異性体薬物の分析

第1節 酸性薬物ケトプロフェンの分析

1-1 ODSカラムによる血中ケトプロフェンの定量

弱酸性非ステロイド系抗炎症剤でアシルプロピオン酸類の一つであるケトプロフェン（以下KPF）は、抗炎症・鎮痛・解熱作用を有している^{7,8)}。これら作用の主な機序は、プロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼの阻害である。図14に示すようにKPFはその骨格に一個の不斉炭素有しており、ラセミ体として投与

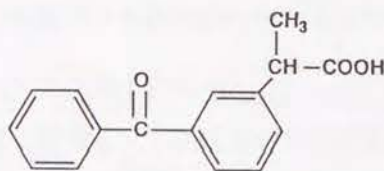


図14 ケトプロフェン（KPF）の化学構造

されている。ところで、光学異性体間の生理活性の違いは、薬効発現に対応するレセプターとの親和性の違い、並びに吸収・分布・排泄及び代謝等の薬物動態の違いに大きく左右される。一般に、2-アシルプロピオン酸類のシクロオキシゲナーゼ阻害作用は*in vitro*では、（S）体の方が（R）体よりも強力である。しかし、*in vivo*ではその差はほとんど認められない。その理由は、生体内で（R）体は（S）体に異性化され、この逆転換が起こらないためである^{7,9)}。

このように不斉炭素有する薬物の光学異性体の体内挙動を把握することは重要である。そこで著者の開発したカラムスイッチングシステム（第1章参照）の血中光学異性体薬物の分析手法としての有用性を示すために、酸性薬物KPFの定量への応用を検討した。

〔試料〕 内部標準物質（以下IS）として安息香酸エチルを用いた。KPFとIS

を添加したヒトプラズマ0.5mlにアセトニトリルを等量加えて、30秒間激しく混合した後10分間遠心分離（毎分3000回転）して、その上清をプラズマ試料とした。別に生理食塩水にKPFとISを添加して同様の操作を行ない標準試料とした。なおIS濃度は1μg/mlとした。

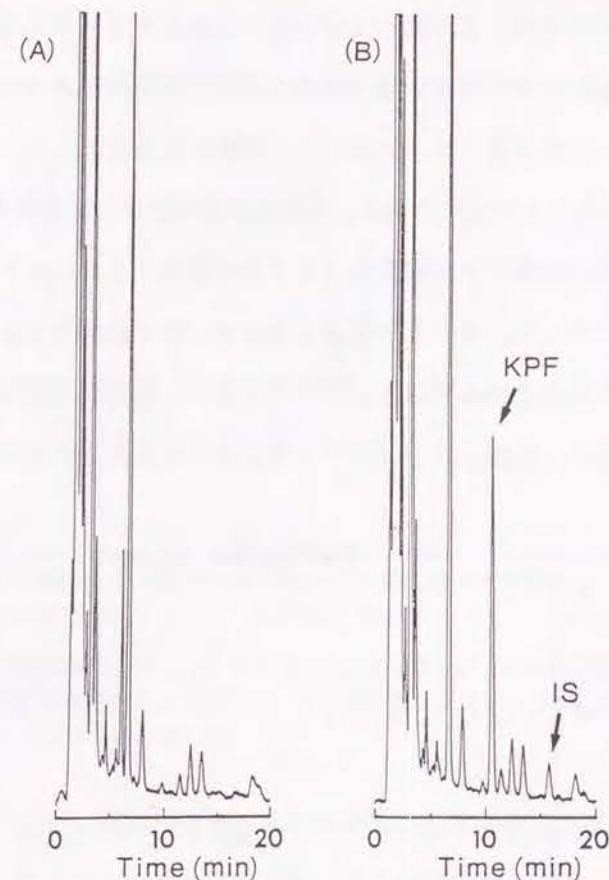


図15 ODSカラムにおけるクロマトグラム
（A）ヒトプラズマブランク試料、（B）ヒトプラズマにKPF（400ng/ml）とIS（1μg/ml）を添加した試料

〔HPLC条件〕 カラム：イナートシルODS-2（長さ15cm x 内径4.6mm）、カラム温度：室温（約22℃）、移動相：アセトニトリル／水／過塩素酸＝30

／70／0.1 (v/v/v)、流速：1.0 ml/min、検出波長：260 nm、
試料注入量：10 μ l

〔結果〕 前述のHPLC条件によりヒトプラズマブランク試料を注入したときに得られたクロマトグラムを図15 (A) に示し、またプラズマ試料を分析したときに得られたクロマトグラムを図15 (B) に示した。このようにKPFとISとはプラズマ成分の影響を受けることなく相互分離できた。次に、標準試料とプラズマ試料におけるKPF (それぞれ500 ng/ml) のピーク面積を求めたところ、KPFの回収率は100.2 \pm 1.4% (n=5) であり、良好な回収率並びに再現性を得ることができた。

プラズマ試料中のKPFの検量線 (KPFの濃度/ISに対するKPFのピーク面積比) を図16 に示した。KPFの濃度10 ng/ml から5 μ g/ml の範囲で、相関係数0.9996の良好な直線性が得られており、臨床濃度範囲をカバーした。

これらの結果は、本法によりプラズマ中に存在するKPFの全濃度を定量できることを示している。

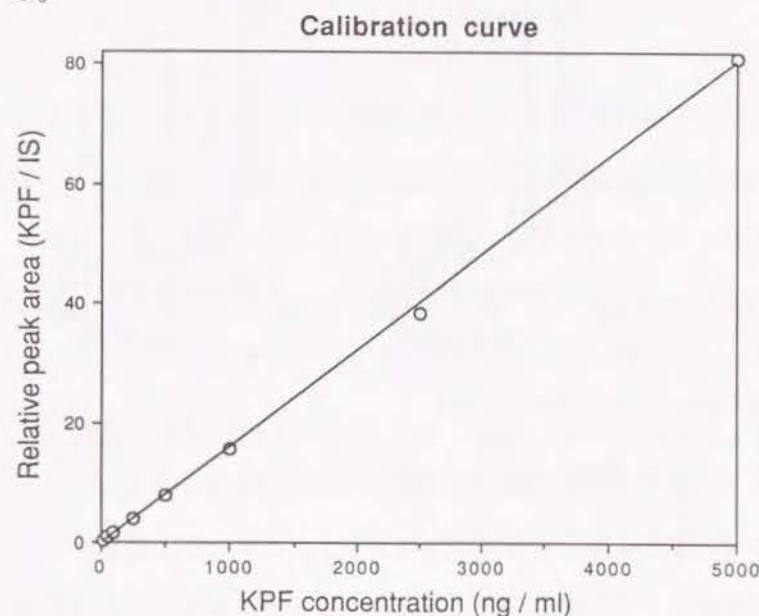


図16 KPFの検量線
～プラズマに添加したKPFの濃度とODSカラムでの分離により得られたISのピーク面積に対するKPFのピーク面積比～

1-2 オボムコイドカラムによる光学分割の検討

長さ15 cm、内径4.6 mmのOVMカラムを室温 (約22 $^{\circ}$ C) で、移動相としてリン酸緩衝液を流速1.0 ml/minで使用してKPFを分離し、検出波長260 nmで検出した。なお、試料としてISを含まないKPF標準試料10 μ lを注入した。

移動相中の有機溶媒種として (A) テトラヒドロフラン (以下THF)、(B) アセトニトリル、(C) エタノールを添加したときのクロマトグラムを図17に示した。

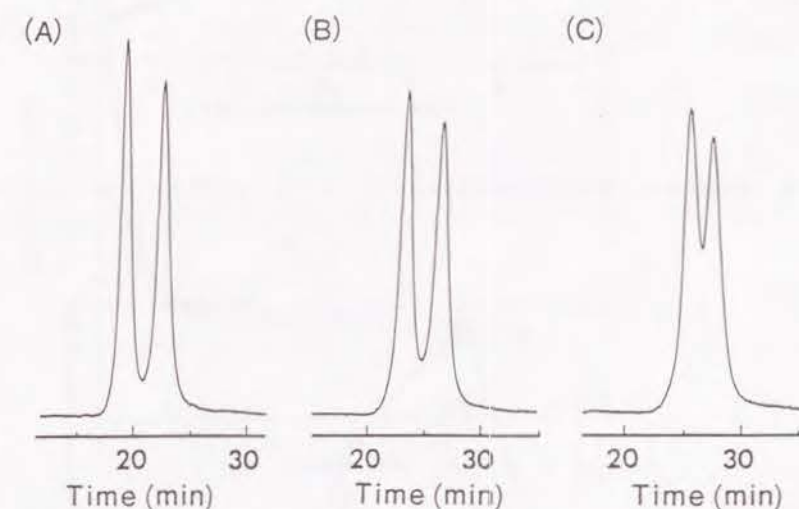


図17 KPF標準試料 (5 ng) のオボムコイドカラムにおける光学分割例
移動相中の有機溶媒として (A) テトラヒドロフラン、(B) アセトニトリル
(C) エタノールを用いた

これらの結果から、この3種類の有機溶媒の中ではTHFを使用した時にKPFの光学分割が最も良いことがわかる。次に移動相中のTHFの濃度とOVMカラムにおけるKPFのキャパシティーファクターとの関係について図18に示した。THF濃度の増加とともにKPFの溶出が早くなったことから、OVMカラムは逆相保持を起こすことが示唆された。またTHF濃度を15%まで高めるとKPFは光学分離されなかった。以上の結果から、OVMカラムからKPFを溶出させるためにはある程度の有機溶媒濃度が必要であるが、高すぎると光学分割能が低下するので、KPFの光学分割を行なうためには、移動相に添加する有機溶媒の種類と濃度の最適化が必要であることが判った。

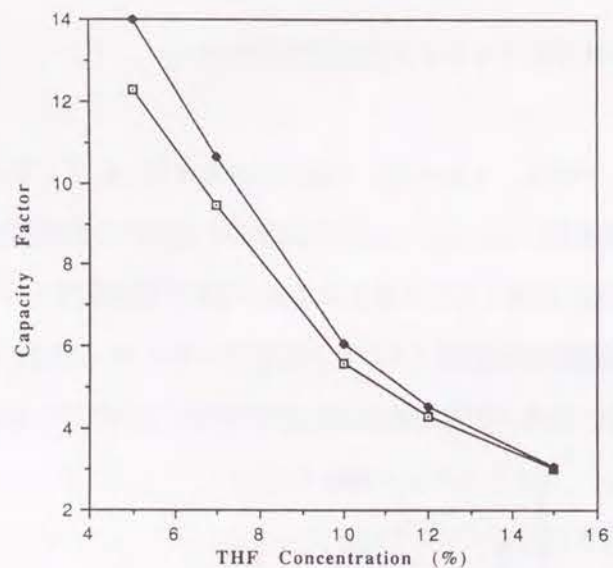


図 1-8 移動相中の THF 濃度に対するオボムコイドカラムでの KPF のキャパシティーファクター

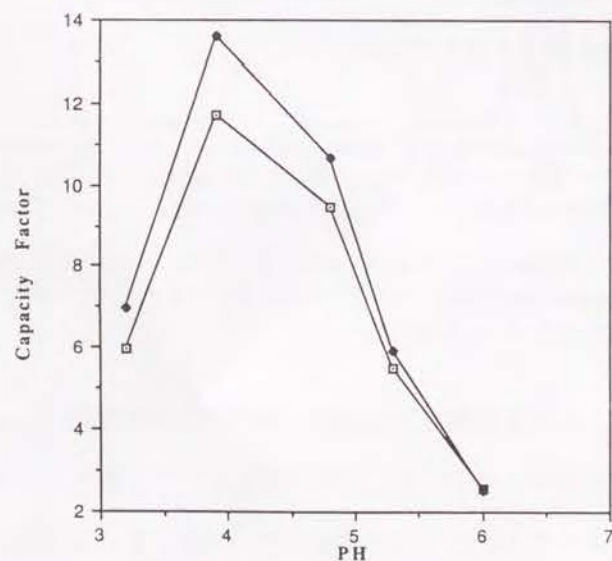


図 1-9 移動相の pH に対するオボムコイドカラムでの KPF のキャパシティーファクター

次に、移動相の pH と KPF の保持時間について検討した結果を図 1-9 に示した。移動相の pH が 4 から 6 へと高くなるにつれて KPF の溶出が早くなり、光学分離能も低下した。これは、KPF の pK_a が約 4 付近であることから、KPF はこの pH 領域

においてイオン化した状態で存在し、またオボムコイドのアミノ酸残基やシアル酸などのカルボキシル基の解離が始まり KPF との静電的反発が強くなるためであると考えられる⁸⁰⁾。一方移動相中の pH が 4 以下になると KPF の保持が再び弱くなる。これは KPF の解離が抑制されて疎水性が増すことに加えて、オボムコイドの極性やコンフォメーションの変化による効果が寄与したためであると思われる^{46, 81)}。

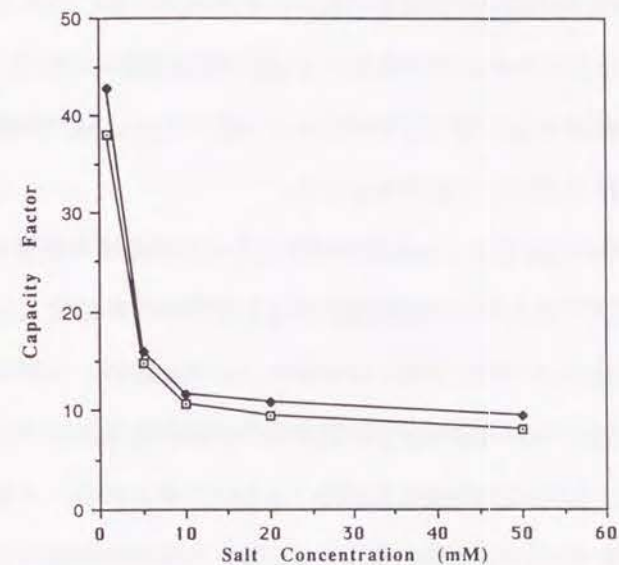


図 2-0 移動相中の塩濃度に対するオボムコイドカラムでの KPF のキャパシティーファクター

次に、移動相の pH を 5 で一定にした時の、移動相中の塩濃度と KPF の保持との関係を図 2-0 に示した。リン酸緩衝液の濃度が 1 ~ 50 mM の範囲では塩濃度に関わらず KPF の光学分離にほとんど影響がなく、また 10 ~ 50 mM の範囲では KPF の保持時間にも影響がなかった。しかし塩濃度が 10 mM から 1 mM に低下するにつれて KPF の保持は急激に強くなった。この結果から、低濃度では静電的な作用が KPF の保持に影響しているものと思われる。

以上の検討から、OVM カラムにおける KPF の保持と光学分割には移動相の有機溶媒の種類および濃度、さらに pH、塩濃度が大きく影響することが判明した。以上の

結果に基づいて、OVMカラムによるKPFの光学分割は、20 mMリン酸緩衝液 (pH 4.5) / THF = 93 / 7 (v/v) の移動相を用いて行なうこととした。

1-3 カラムスイッチングによるオンライン分析

ODSカラムによりプラズマ成分とKPF、ISを分離定量した後、OVMカラムでKPFの光学分割を行なうためにカラムスイッチングシステム (図5) によりオンライン分析を試みた。濃縮カラムとしてOVMカラム (長さ10 mm、内径4.6 mm) を使用し、バルブ切り換えは全て手動で行なった。

第2節で述べたようにOVMカラムは移動相のpHや有機溶媒の影響を受けるので、オンライン化に際してOVMカラムに溶媒組成が大きく異なる移動相1が流入しないように配慮しなければならない。そのためには濃縮カラムで移動相1を除去してKPFを濃縮後、KPFをOVMカラムに送り込む必要がある。KPFを濃縮カラム先端で確実に保持させるためには、移動相2の溶出力が弱いことが要求される。そこで前項で検討した結果に基づき、移動相2の組成は1 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 4.2) とし、ポンプ2の流速3 ml/min、ODSカラムから溶出したKPF画分 (ループ中) を約30倍に希釈しながら濃縮カラムへ送り込んだ。

表1 カラムスイッチング法により光学分割を行なったときの再現性 (5回繰り返し)

t_1 は最初に、 t_2 は2番目に溶出する光学異性体の保持時間を表す

R_s は光学異性体間の分離度を表す

* カラムスイッチングを用いず直接OVMカラムで分析した結果

	t_1 (min)	t_2 (min)	N_1	N_2	R_s	N_1^*	N_2^*	R_s^*
Mean	19.95	22.85	2828	2195	1.662	3280	3198	1.847
RSD (%)	0.83	0.84	2.18	3.49	5.07	—	—	—

プラズマ試料中のKPFをオンライン分析した結果は既に第1章図13 (A) に示した。プラズマ成分の妨害を受けることなくKPFの光学分離を行なうことができた。次に本法の再現性について検討した。同一のプラズマ試料を5回繰り返し注入して、上記のカラムスイッチング法により光学分割を行なった結果を表1に示した。KPFの溶出時間は一定であり良い再現性が得られた。しかしOVMカラムでのKPFエナンチオマーの理論段数 (N) は、本システムを使用せずKPF標準試料を直接OVMカラムに注入して分析したときの理論段数 (N^*) に比較して、いずれも若干の低下が認められた。これは濃縮カラムからOVMカラムにKPFを送り込むときの拡散が影響しているものと思われる。

著者の開発したカラムスイッチングシステムにより、血中KPFの定量及び光学分割が可能であることを示した。YagiらはカラムスイッチングHPLC法による血中KPFの光学分割について報告している^{8,2)}。その方法では、血清タンパクの除去とKPFの濃縮を同時に行える前処理カラムと、光学分割を行なうためのカラムを組み合わせ使用しており、そのシステムは図1と類似している。この方法では、種差や固体差による血中低分子成分の変動や、内部標準物質の使用、代謝物・併用薬物の影響を回避する際に、困難が予想される。これに対して、著者の開発したカラムスイッチングHPLC法では、多くの化合物の分離が可能であることから現在最も汎用されているODSカラムが使用できるので、KPFと他の成分を分離可能であると考えられる。また、図1のようなシステムでは、薬物に対する前処理カラムの保持力が、光学分割用カラムの保持力より小さくしなければならず、前処理カラムの選択幅が狭い。それに対して本システムでは希釈管と濃縮カラムの使用により移動相の変換が可能なることから、原理的には水系移動相が使用可能な種々のカラムを用いることができるので、より多くの血中光学異性体の分析に応用可能であると考えられる。

第2節 塩基性薬物ベラパミルの分析

2-1 血中のベラパミルとその代謝物の定量

ベラパミル (VA) は虚血性心疾患治療剤として臨床使用されている薬剤である。その作用機序は、筋細胞へのカルシウムの流入を抑制して、抹消血管抵抗を減少させ血圧を下げて心臓の負担を軽減させるものである。またVAは同時に冠血流量を増大し虚血心筋での酸素需要バランスを調整する⁸³⁻⁸⁵⁾。

VAは分子中に1個の不斉炭素有しているが、本品はラセミ体として市場に供給されている。血漿中のVAのタンパク結合率はd体が約94%、l体が約86%であり、l体のEC₅₀はd体のそれより10倍以上高い⁸⁶⁻⁸⁸⁾。また生体に投与後VAは様々な代謝を受け、未変化体の約20%程度の活性を持つ代謝物があることも知られている⁸⁴⁾。そしてこれら代謝物も全て不斉炭素有している。従って、これらのエナンチオマー間の吸収・分布・代謝・排泄の違いを把握することはVAの薬効・安全性を研究するうえで非常に重要である⁸⁹⁾。そこで、塩基性薬物VAをモデル化合物として、血漿中のVAとその代謝物を一斉に分離定量し、かつ光学分割を行なうことにより、著者の開発したカラムスイッチングシステムの有用性について検討した。なお、図2-1に検討に使用したVAとその代謝物5種類の構造を示した。

〔抽出操作〕 ヒトプラズマに予め既知濃度 (10~200 ng/ml) のVAとその代謝物5種類を添加したサンプルをプラズマ試料とし、生理食塩水に同じくVAとその代謝物5種類を添加したサンプルを生理食塩水試料とした。まずプラズマ試料1 mlをガラス試験管に入れ、1 Mの水酸化ナトリウム水溶液0.1 ml並びに酢酸エチル2 mlを加えて15分間混合した後、遠心分離 (毎分3000回転で5分間) を行なった。次に、ドライアイスで冷やしたエタノールに試験管を入れ下層 (水層) を凍らせ、上層 (酢酸エチル層) だけを別のガラス試験管に移した。これに1%リン酸水溶液を0.5

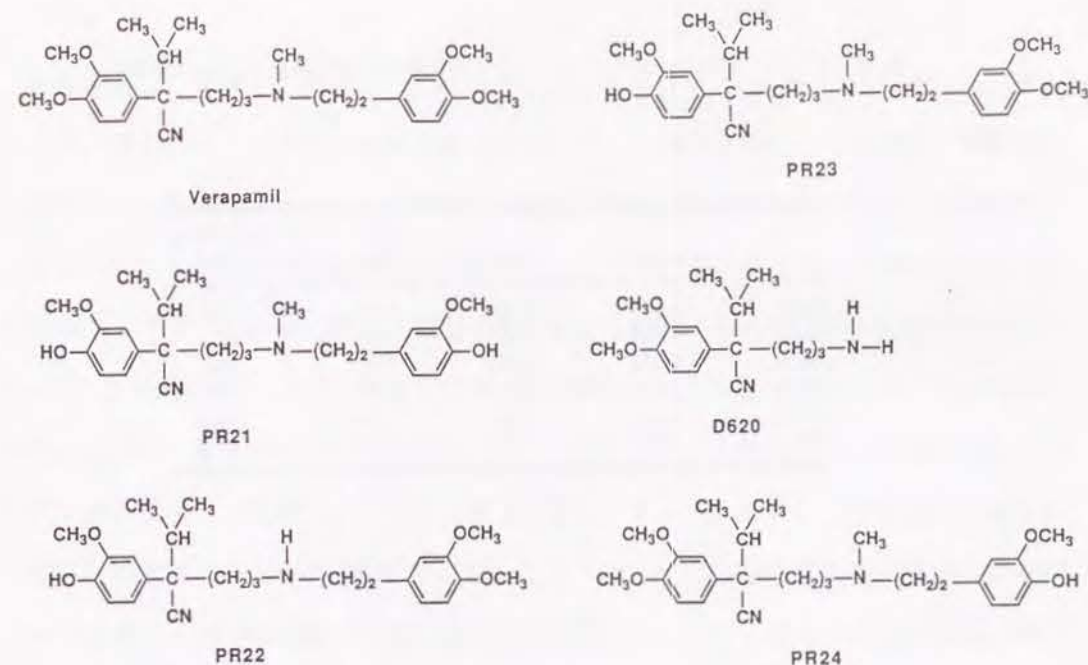


図2-1 ベラパミルとその代謝物の化学構造

ml加えて15分間混合し、遠心分離 (毎分3000回転で5分間) を行なった。上層 (酢酸エチル層) をガラスピペットで取り除き、下層 (水層) をプラズマ抽出試料とした。このプラズマ抽出試料 (150 μl) と、別に同じ濃度の抽出操作を施さない生理食塩水試料 (75 μl) をHPLCで分析し、そのピーク面積を比較することによって本操作における回収率と再現性 (n=6) を検討し、その結果を表2に示した。極性の高い代謝物ほど回収率が低く、相対標準偏差は5%前後であった。

〔HPLCによる定量〕 血中のVAとその代謝物の同時定量法はいくつか報告されている⁹⁰⁻⁹⁴⁾。一般に塩基性薬物をODSカラムで分離する際、イオンペア法が用いられることが多く、VAとその代謝物の同時分析の報告例もその例外ではない^{95, 96)}。また著者の開発したカラムスイッチングシステム (図5) に応用するためには、目的の化合物を含むODSカラムからの溶出画分を全てサンプルループ (2 ml容量) に取り込むことが望ましい。そのため、目的ピークの幅をできるだけ狭くする必要がある。こ

表2 プラズマ試料からのベラパミルとその代謝物の回収率とそれらの再現性
a: Peak area ratio

	PAR ^a	SD	CV (%)	Recovery (%)
D620	0.568	0.038	6.67	34.1
PR21	1.588	0.043	5.50	67.1
PR22	1.232	0.055	3.47	68.1
PR23	1.261	0.050	4.33	76.0
PR24	1.259	0.066	4.01	74.5
VA	1.378	0.070	5.07	89.2

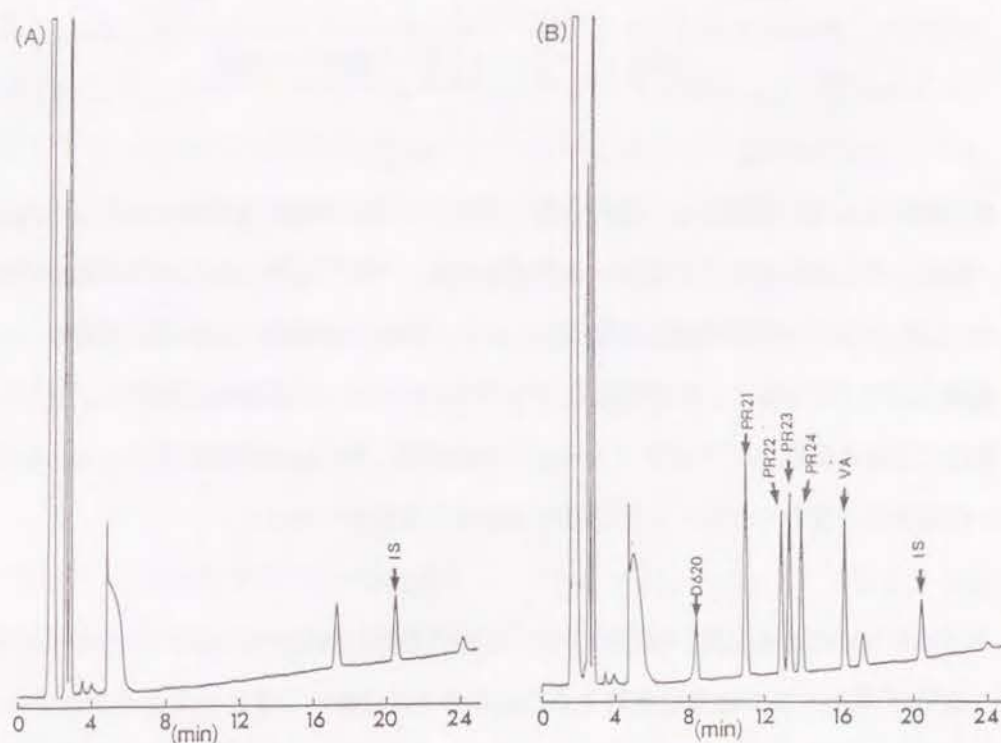


図22 プラズマ試料を前処理操作後、ODSカラムにより得られた分離例
(A) プラズマブランク、(B) ベラパミルとその代謝物をそれぞれ100 ng/mlずつ添加したプラズマ試料

れらを考慮してHPLC条件として、カラムはイナートシルODS—2カラム(15 cm x 4.6 mm)、カラム温度は室温(約22℃)、検出波長は280 nm、移動相はアセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸(初め25/75/0.1から25分後に50/50/0.1の割合になるような直線グラジェント)、流速は1 ml/minとした。またオートインジェクターの注入誤差を補正するために、上記プラズマ抽出試料(0.4 ml)に内部標準としてパラヒドロキシ安息香酸n-プロピル(400 ng/ml)を0.05 ml加えたものを注入試料とし、その150 μlをHPLCに注入した。プラズマ抽出試料(各薬物100 ng/mlおよびブランク)について本HPLC法により分析したクロマトグラムを図22に示した。このHPLC条件により、各薬物及びプラズマ成分とを良好に分離できた。また表3に示したように、VAとその代謝物の検量線(10~200 ng/ml)は良好な直線性($r > 0.99$)を示した。

表3 ベラパミルおよびその代謝物の検量線から得た最小二乗法による計算式と相関係数

D620	$r = 0.9987$	$Y = -1.7922e - 2 + 6.1290e - 3X$
PR21	$r = 0.9978$	$Y = -9.2991e - 2 + 1.5344e - 2X$
PR22	$r = 0.9990$	$Y = -2.5055e - 2 + 1.3962e - 2X$
PR23	$r = 0.9988$	$Y = -2.5145e - 2 + 1.3161e - 2X$
PR24	$r = 0.9988$	$Y = -3.5275e - 2 + 1.3128e - 2X$
VA	$r = 0.9982$	$Y = 1.5881e - 2 + 1.2754e - 2X$

以上の検討から本法により血中のVAとその代謝物5種類の血漿中総濃度(両異性体の和)を同時に定量できると考えられる。

2-2 オボムコイドカラムによる光学分割の検討

光学活性な固定相と水系移動相によるVAの光学分割法として、 α_1 -酸性糖蛋白

固定化カラム (CHIRAL-AGPカラム) や β -シクロデキストリンやその誘導体を固定化したカラムを利用した例が報告されている。しかしカラムの寿命が短い、光学分割能が充分ではないなどの点が指摘されている^{97, 98)}。そこで著者はOVMカラムを用いて、VAとその代謝物の光学分割条件を検討した。このときのHPLC条件は、内径4.6 mm、長さ15 cmのOVMカラム、移動相としてリン酸緩衝液/エタノール混液、流速は1.0 ml/min、検出波長230 nm、カラム温度は室温 (約22℃) であった。

図23に移動相のpH (エタノール濃度10%) と各化合物のキャパシティーファクターの関係を示した。移動相のpHが高くなるにつれて各化合物の保持が強くなった。ここでVAのpKaは約8.8である⁹⁹⁾ ことから図23に示したpH範囲ではVAの電荷状態はほぼ一定であると考えられる。従ってこのような保持の変化はオボムコイドが移動相のpH変化の影響を受けたためであると思われる。またこのときの光学分離の程度を表4に示した。移動相のpHが3のときは、未変化体・代謝物ともにOVMカラムに対する保持が極めて弱いので光学分割されなかった。また分子量が最も小さいD620は保持が弱いもののpHを6.2まで上げることで分離が可能になった。しかし2級アミンであるPR22は光学分割されなかった。

移動相のpHを4.8に調製して、エタノール濃度と各化合物のキャパシティーファクターについて検討した結果を図24に示した。エタノール濃度が高くなるにつれて、いずれの化合物もOVMカラムからの溶出が早くなった。このことからOVMカラムでのVAとその代謝物の保持には疎水的作用が大きく寄与しているものと考えられる。そこで光学分割能に対するエタノール濃度の影響について調べ、その結果を表5に示した。移動相中のエタノール濃度が3%のときPR22を含む全ての化合物の光学分割が可能であり、エタノール濃度が高くなるにつれて分離が低下した。このことからVAやその代謝物をOVMカラムから適度な分析時間内に溶出させるためには、移動相中に適度のエタノールが必要であることがわかった。しかしオボムコイドの光学認識能はエタノール含量が少ないほど優れているので、結局これらのバランスが大切である。

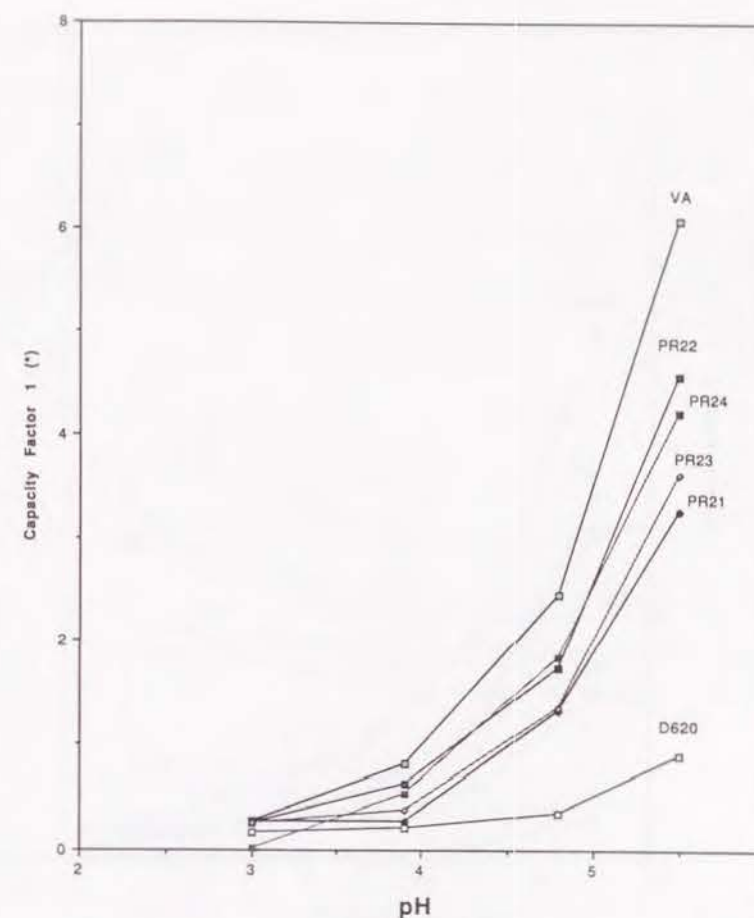


図23 移動相のpHと各化合物のキャパシティーファクターとの関係について
* 初めに溶出するエナンチオマーのキャパシティーファクターのみ表示

表4 移動相のpHと各化合物の分離係数について

	pH				
	3.0	3.9	4.8	5.5	6.2
D620	1	1	1	1	1.28
PR21	1	4.04	4.04	4.92	—
PR22	1	1	1	1	—
PR23	1	2.11	1.91	1.83	—
PR24	1	1.49	1.71	2.03	—
VA	1	1.22	1.37	1.47	—

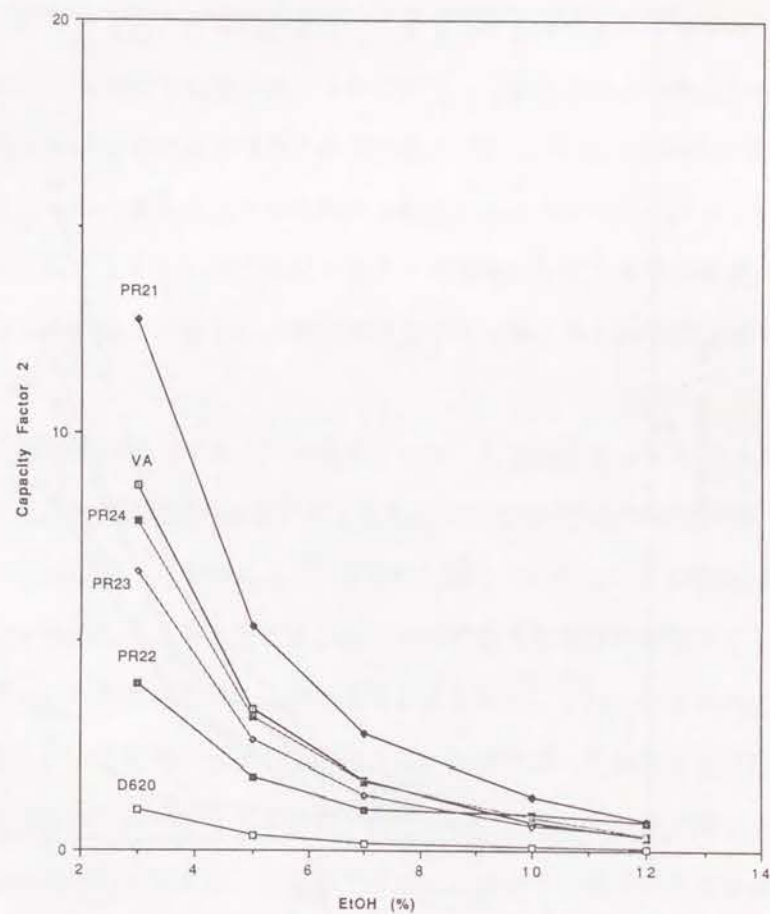


図2-4 移動相中のエタノール濃度と各化合物のキャパシティーファクターとの関係について
* 初めに溶出するエナンチオマーのキャパシティーファクターのみ表示

表5 移動相中のエタノール濃度と各化合物の分離係数について

	3%	5%	7%	10%	12%
D620	1.23	1	1	1	1
PR21	4.40	4.04	3.70	3.09	3.03
PR22	1.09	1	1	1	1
PR23	2.29	1.91	1.68	1.44	1
PR24	1.96	1.71	1.57	1.40	1
VA	1.46	1.37	1.31	1.19	1

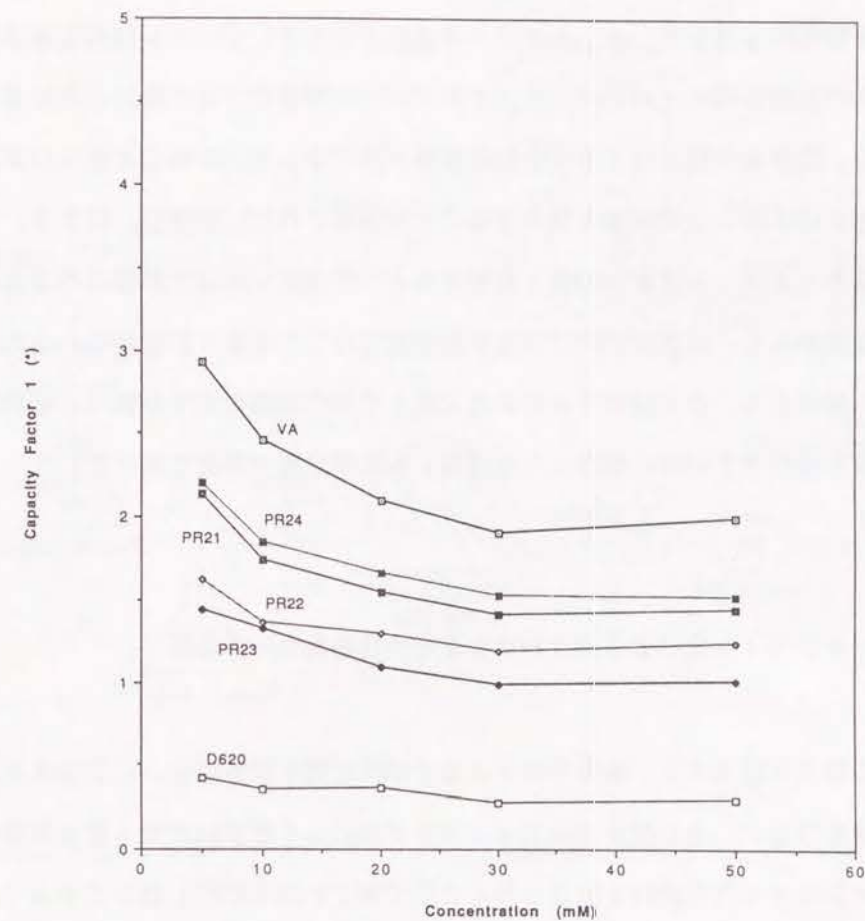


図2-5 移動相中のリン酸緩衝液の塩濃度と各化合物のキャパシティーファクターとの関係について
* 初めに溶出するエナンチオマーのキャパシティーファクターのみ表示

表6 移動相中のリン酸緩衝液の塩濃度と各化合物の分離係数について

	5 mM	10 mM	20 mM	30 mM	50 mM
D620	1	1	1	1	1
PR21	4.91	4.04	3.62	3.60	3.44
PR22	1	1	1	1	1
PR23	1.95	1.91	1.87	1.90	1.86
PR24	1.94	1.71	1.56	1.56	1.49
VA	1.45	1.37	1.30	1.31	1.27

次に移動相の pH を 4.8、エタノール濃度を 5% として、リン酸緩衝液の塩濃度と VA とその代謝物のキャパシティーファクターとの関係について検討した結果を図 25 に示した。塩濃度が低いほど各化合物の保持が強くなった。このことから OVM カラムでの保持にはイオン交換作用も寄与することが示唆された。しかし、図 23、24 に示した pH やエタノール濃度の影響と比較すると、塩濃度が及ぼす影響は小さく、表 6 に示した結果からも、塩濃度の変化は光学分割能に対してあまり影響がなかった。

以上の検討から、OVM カラムによる VA とその代謝物の光学分割は、有機溶媒や pH の影響を受けやすいが、検討した 6 種類とも光学分割が可能であった。

2-3 オンライン化によるベラパミルとその代謝物の一斉分析

以上の結果を踏まえて、血漿中の VA とその代謝物を前処理後、ODS カラムにより分離定量を行ない、その後カラムスイッチング法により OVM カラムで光学異性体比を求めるオンライン化の検討を行なった。ここで第 1 章図 5 に示したシステムでは、1 度の試料注入により ODS カラムから OVM カラムへ送り込める画分は 1 つだけであり、その他の画分はドレインからシステム外へ排出されていた。そこで分析の効率化を目指して 6 方バルブ 2 個と 2 ml 容量のサンプルループ 6 本を用いて、1 度の試料注入で 6 つの画分まで取り込めるようなシステムを開発した (図 26)。

[操作手順] インジェクターより注入した試料を ODS カラム (COLUMN 1) により分離して、280 nm で検出 (DETECTOR 1) して各物質の総濃度 (d 体と l 体の合計濃度) を定量する。このとき目的とする第 1 のピークが検出され始めたら VALVE I を切り換えてその画分を 1 番目のサンプルループに取り込む。そのピークが検出されなくなったら直ちに VALVE I を元に戻す。次にサンプルループを 2 番目のサンプルループに合わせ、第 2 のピークをこの 2 番目のサンプルループに取り込む。以下同じ操作を繰り返して合計 6 種類の画分をサンプルループに取り込む。次に 1

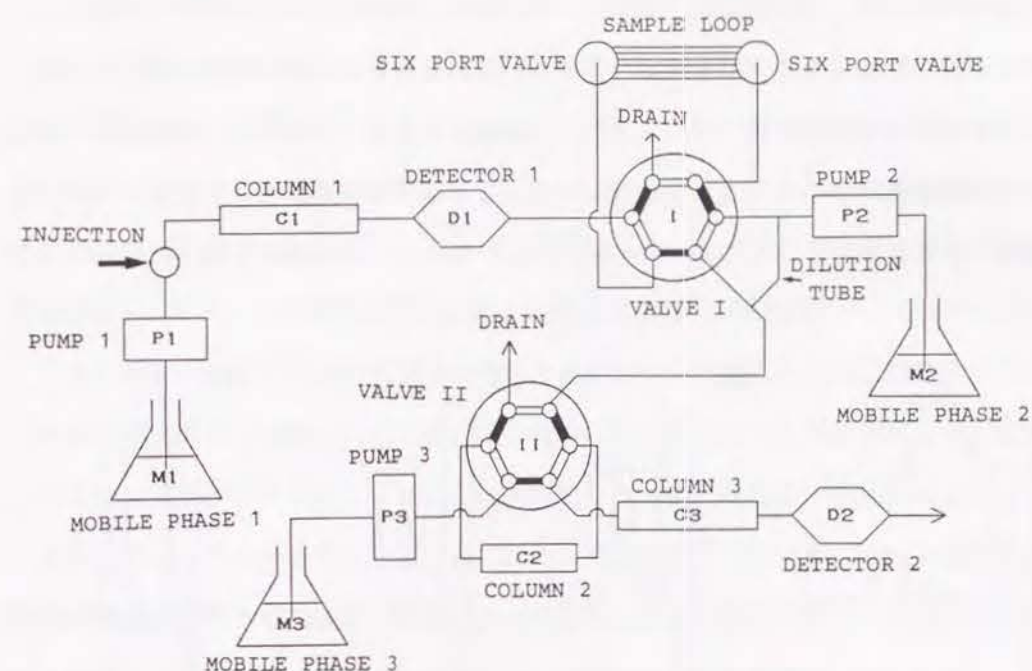


図 26 希釈管と濃縮カラムおよびサンプルループを組み込んだカラムスイッチングシステム

番目のサンプルループに取り込んである試料を希釈管により移動相 2 で適度に薄めながら濃縮カラム (COLUMN 2) 上に濃縮させる。そして VALVE II を切り換えて移動相 3 により濃縮カラムから OVM カラム (COLUMN 3) に送り光学分割を行ない 230 nm で検出 (DETECTOR 2) することにより光学異性体間の濃度比を求める。その後、2~6 番目のサンプルループ中の試料についても同様の操作を行なう。なお第 1 章で述べたように目的の化合物を効率よく濃縮カラムに保持させるために移動相 2 の組成と希釈倍率の選択が重要である。濃縮カラムは OVM カラムを使用しているので、前節での検討結果から OVM カラムに対する VA とその代謝物の保持を最も強くする溶媒組成を移動相 2 とした。また希釈率は 10 倍にして移動相 1 の影響を抑えた。

[HPLC 条件] COLUMN 1: ODS カラム (長さ 15 cm、内径 4.6 mm)、COLUMN 2: OVM カラム (長さ 10 mm、内径 4.6 mm)、COLUMN 3:

OVMカラム（長さ150mm、内径4.6mm）、移動相1：アセトニトリル／水／トリフルオロ酢酸（25／75／0.1（v／v／v）から50／50／0.1（v／v／v）へ25分間の直線グラジエント）・流速1.0ml／min、移動相2：5mMリン酸緩衝液（pH7.5）・流速4.0ml／min、移動相3：10mMリン酸緩衝液（pH4.8）／エタノール＝90／10（v／v）・流速1.0ml／min。

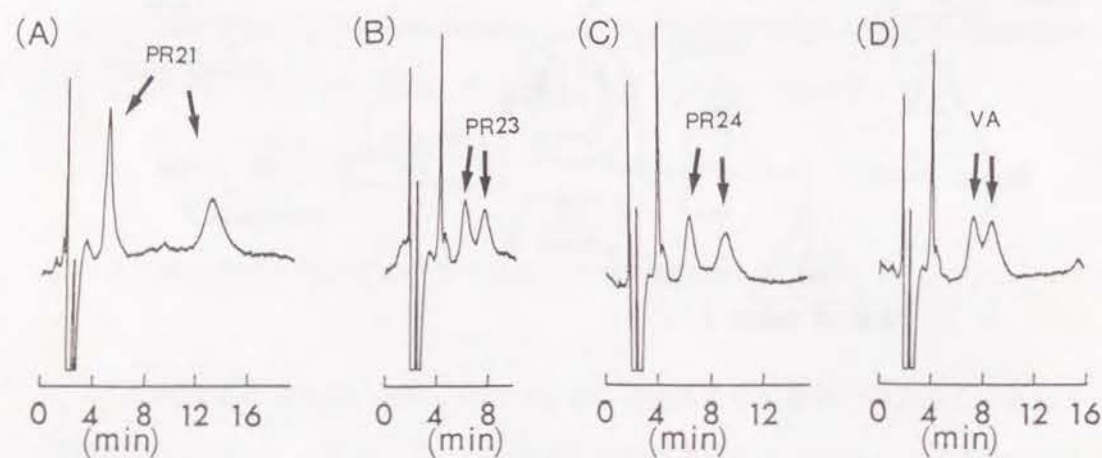


図2-7 プラズマ試料を注入してカラムスイッチングシステムの検出器2より得られたクロマトグラム

表7 カラムスイッチング後のオボムコイドカラムにおけるキャパシティーファクター（ k ）および分離係数（ α ）とオボムコイドカラムに直接注入して得られた結果との比較

	After column switching			Direct injection		
	k_1	k_2	α	k_1	k_2	α
VA	3.05	3.82	1.25	0.55	0.66	1.19
PR21	1.79	6.27	3.50	0.41	1.27	3.09
PR22	2.53	2.53	1	0.85	0.85	1
PR23	2.38	3.07	1.29	0.40	0.57	1.44
PR24	2.79	4.07	1.46	0.54	0.76	1.40
D620	0.71	0.71	1	0.06	0.06	1

〔結果〕 検出器2で得られたクロマトグラムを図2-7に示した。VAとその代謝物のうち3種類の光学分割ができた。前節での結果からOVMカラムにより今回用いた化合物6種類とも光学分割は可能であったが、このオンライン化の条件では代謝物のうちPR22とD620の同時光学分割はできなかった。本システムの再現性を調べるためにVAについて繰り返し分析（ $n=8$ ）した結果、OVMカラムでの保持時間の相対標準偏差は1.8%、光学異性体間の濃度比の再現性の相対標準偏差は2.1%であった。

本システムのVAとその代謝物の各エナンチオマーの保持と光学分割能を、OVMカラムに標準試料を直接注入して得られた結果と比較して表7に示した。いずれの化合物もカラムスイッチング法により溶出時間が長くなった。これは、目的試料を濃縮カラムからOVMカラムへ送り込むときに、VALVE II（図2-6）を切り換えた直後はまだ濃縮カラムやその前後の配管の中は移動相2で満たされており、これが移動相3と入れ替わるのに時間を要するからである。光学異性体の分離係数（ α ）に関しては表7に示したように両者であまり差がなかったことから濃縮カラム内での試料の拡散は小さいことがわかった。

以上、プラズマ中のVAとその代謝物の定量と光学分割を本システムによりオンラインで行なうことが可能となった。このシステムの自動化は容易であるので、体内動態研究や臨床分析のように多数の検体の分析に有効であると思われる。

第3章 血清試料直接注入可能なアビジンカラムの開発

第1節 前処理なしの血清中薬物分析とアビジンカラムの合成について

薬物動態の研究や臨床化学の実務において生体試料（血液や尿など）中の薬物濃度を分析する必要がある。しかし、生体試料は複雑な混合物なので、その分析には妨害物質を除去する前処理操作が必須となる。ところが、一般に前処理操作は、煩雑さを伴ない時間がかかり、操作上の個人差を生じたり、高い回収率や再現性が得られないこともある。また薬物や代謝物が不安定な場合は前処理操作中に分解が起こることもある。

一方、HPLC法により分析する際、血清試料などタンパクを含む試料を直接ODSなどの逆相系のカラムに注入すると、タンパクの変性に伴う不溶化や固定相への不可逆的な吸着が生じるため、カラム性能の劣化やカラム圧の上昇の原因となる¹⁰⁰⁾。このため固定相や移動相を工夫することにより血清試料を前処理操作することなく直接HPLCに注入し、薬物濃度を定量する試みが報告されている^{101, 102)}。例えばシリカゲルを担体として生体試料を直接注入することが可能な固定相として、シリカ粒子の細孔外に親水性のジオール基を、細孔内に疎水性のトリペプチド鎖⁵⁴⁾あるいはアルキル鎖¹⁰³⁾を導入した内面逆相型固定相（Pinkertonカラム）、親水性のポリオキシエチレン基に疎水性のフェニル基を導入した固定相（Shield Hydrophobic Phaseカラム）^{104, 105)}、細孔外にポリオキシエチレン基を化学結合し細孔内には疎水基を導入した固定相（Semipermeable Surfaceカラム）¹⁰⁶⁾、疎水性基と親水性基が混在する固定相（Mixed Functional Phaseカラム）^{107, 108)}、外層に親水性のパーフルオロブチルエチレン基を内層に疎水性のオクタデシル基を導入した固定相（Dual Zoneカラム）¹⁰⁹⁾およびODSカラムの細孔外に変性したBSAをコーティング処理した固定相（BSAコーティングカラム）^{110, 111)}などが知られている。これらの充填剤はいずれも疎水性基と親水性基を合わせもち、サイズ排除モードと逆相分配モードとを同時に

有している。つまりタンパクなど大きな分子は吸着されることなく排除され、一方薬物など低分子は疎水性基に保持されることにより血清中の薬物の直接分離定量を可能としている。医薬品の分析対象となる生体試料は一般に複雑な共存物質を含むことが多いので、高い分離能や検出感度とともに、より高い効率化が要求される。そのために、このような前処理なしに血清試料を直接HPLCに注入し分析できるカラムの使用が有効である。

1990年Haginakaらは β -シクロデキストリンとジオール基を合わせもつMixed Functional Phaseカラムにより血清試料を直接注入して同時に光学分割も可能とした¹¹²⁾。しかしながらシクロデキストリン分子はその分子内に不斉場を形成する空孔を有し、その空孔への取り込みの僅かな違いにより光学異性を認識するものであり¹¹³⁾、このカラムによる血清試料の直接注入可能な対象化合物の種類は限られており、新たなカラムの開発が望まれていた。そこで血清試料の直接注入が可能で、かつ光学分割能を有するタンパク固定化カラムの開発を試みた。

血清試料を直接注入する場合、移動相中の有機溶媒による血清タンパクの変性を考慮しなければならない。Pinkertonらは移動相中の有機溶媒含量とタンパクの変性について種々検討して、例えばアセトニトリルを使用する場合はその含量が25%以下にすることを推奨している⁵⁴⁾。従って、低い有機溶媒濃度により薬物が溶出されることが要求される。また、血清タンパクが保持されることなく排除させるためには、血清タンパクと接触する固定相表面が親水性、非吸着性である必要がある。アビジンは約8%の糖を含む分子量6万8千の塩基性タンパクで、分子量1万7千の4個のサブユニットからなる^{114, 115)}。MiwaらはHPLC用カラムとしてアビジン固定化カラムが光学分割能を有することを報告している¹¹⁶⁾。このアビジン分子はその表面に糖を有している¹¹⁷⁾ために親水性が高く、かつ固定相担体として用いられるシリカゲルの細孔内には侵入できず、シリカゲル表面のみを覆うものと考えられる。以上のことから血清直接注入できる光学分割用固定相としてアビジンカラムを開発した。

図28にアビジンの精製フローチャートを示した。得られた精製アビジンを安定な

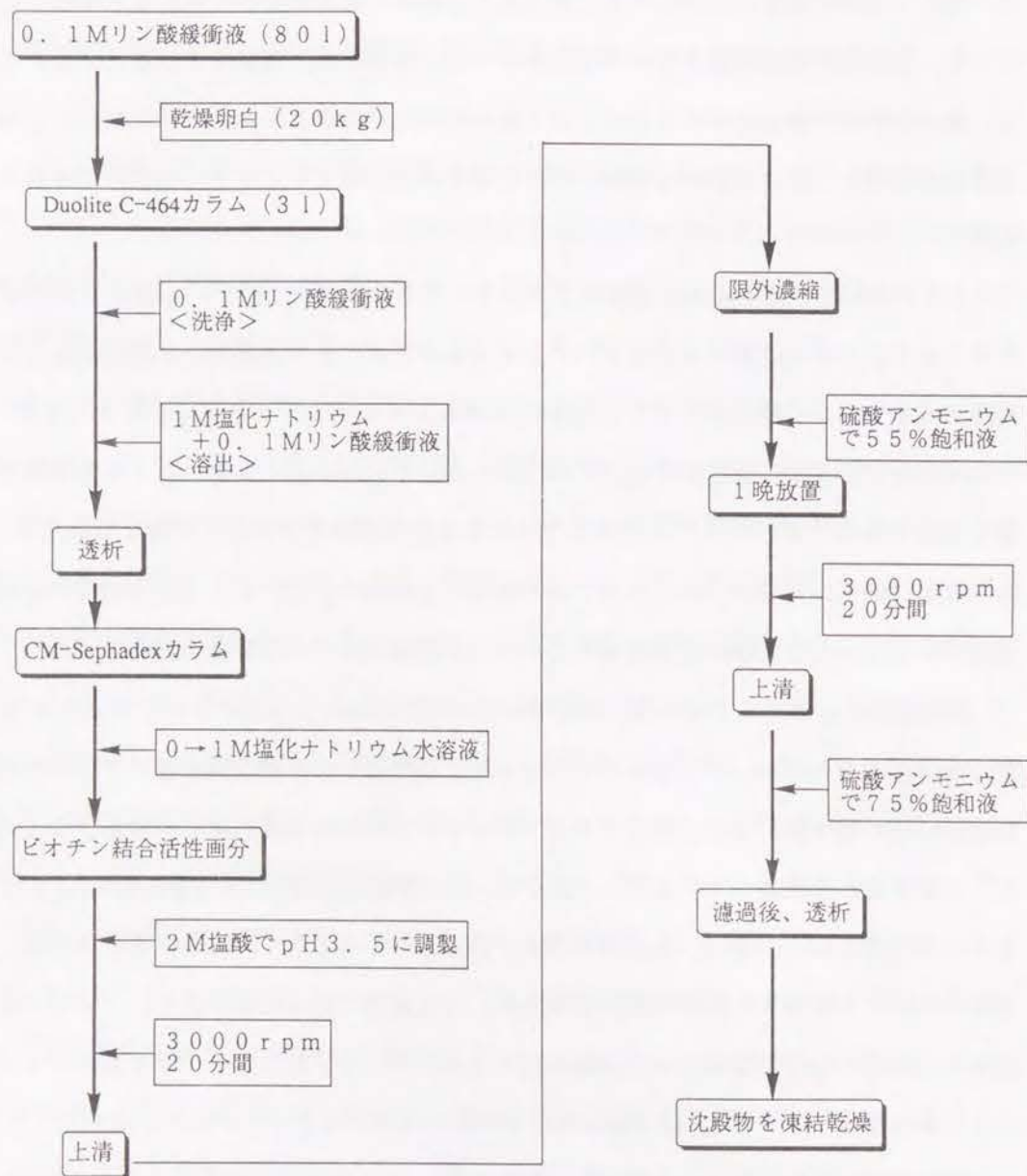


図 28 卵白からアビジンを精製するフローチャート

HPLC 用カラムとして利用するためには、担体に化学的に結合させる必要があるが、この固定化に必要な反応条件としてアビジンやシリカゲルの安定性を考慮した緩やかな条件（温度、有機溶媒、pH など）が要求される。N-hydroxysuccinimide (NHS) homo-bifunctional 架橋剤は水溶液中（pH 7～9）で 1 級アミンと容易に反応して化学的に安定なアミド結合を作ることが知られており、種々のタンパク固定化に用いられている^{118, 119}。またアフィニティークロマトグラフィーでは、担体と固定化されるタンパクとの間にスペーサーを介在させることによりその性能が左右されることが知られている¹²⁰。そこで NHS の 1 種である Disuccinimidyl suberate (DSS) を介して、アミノプロピルシリカゲルにアビジンを固定化した。アビジンカラムの合成経路を図 29 に示した。

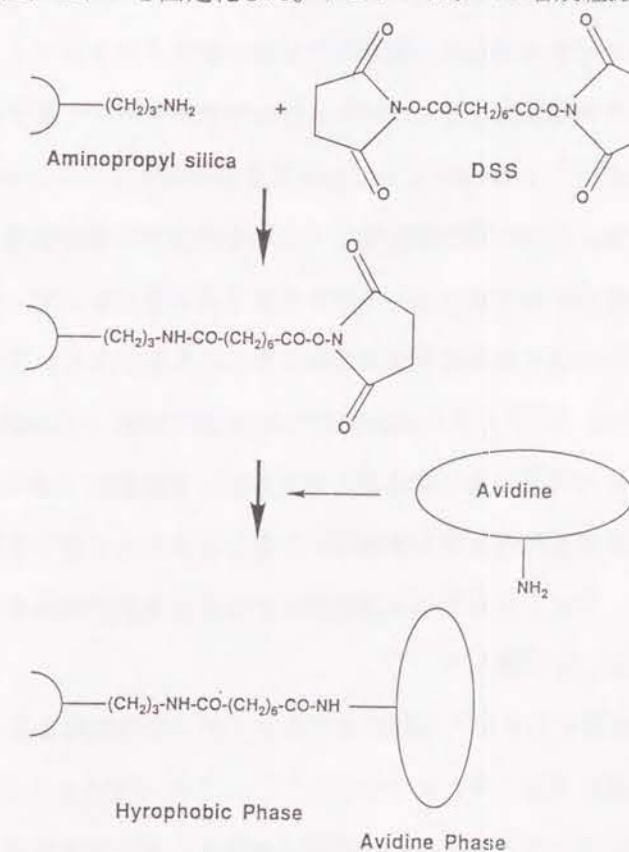


図 29 アビジンカラムの合成経路

まずアミノプロピルシリカゲルを長さ 250 mm・内径 4.6 mm のステンレス管にスラリー法で充填した。次に DSS (300 mg) を 30 ml の 0.1 M 炭酸水素ナトリ

ウム水溶液／アセトニトリル＝1／2に溶かして、カラムの中を室温で4時間循環させた後、20 mlの水／アセトニトリル＝1／2により洗浄した。次に充分量の0.1 M炭酸水素ナトリウム水溶液をカラムに流した後、アビジン（500 mg）の0.1 M炭酸水素ナトリウム水溶液（30 ml）を4時間室温でカラム内を循環させた。

第2節 血清試料直接注入の検討

血清試料の直接注入を可能にするために、血清タンパクの変性に伴う沈殿の生成や固定相への不可逆的吸着の有無を検討する必要がある。そこでアビジンカラムに血清試料を直接注入してタンパクの溶出率（回収率）を調べた。

タンパクの回収率の評価法としてクマシーブリリアントブルー（CBB）を用いた色素結合法を採用した¹²¹⁾。CBB 100 mgを含む50 mlのエタノールにリン酸100 mlを加えた後、水で希釈して全量1 lとした溶液をCBB試液とした。移動相として0.1 Mリン酸緩衝液／アセトニトリル＝90／10（v／v）を流速1 ml／minで流し、アビジンカラムにヒト血清試料20 μ lを注入した。注入後、タンパクのピークの溶出し終わる（UV 280 nmでモニター）までの10分間溶出液を分取し、その0.5 mlとCBB試液5 mlを混合して5分後に595 nmにおける吸光度を測定した。なおタンパクの回収率はヒト血清試料20 μ lを上記と同じ移動相10 mlにより希釈し、その0.5 mlとCBB試液5 mlを混合して5分後に595 nmにおける吸光度を100%として計算した¹²²⁾。

アビジン（分子量約6万8千）以外にオボムコイド（分子量約2万8千）およびオボアルブミン（分子量約4万5千）についても¹¹⁴⁾、DSSを介してアミノプロピルシリカゲルに固定化してカラムに充填し、同様に血清タンパクの回収率を調べた。その結果を表8に示した。移動相のpHが7あるいは2のときアビジンカラムからのタンパク回収率が高く、血清直接注入が可能であると考えられた。これは、担体として用いたシリカゲルやスパーサーとして用いたDSSが固定化されたアビジン分子によって覆わ

表8 血清直接注入によるタンパク固定化カラムからの血清タンパクの回収率

pH ^a	Recovery (%)			
	Avidin	Ovomucoid	Ovalbumin	Avidin (DSS-C ₁₀)
2	97	30	87	28
4.5	24	6	3	4
7	92	38	72	13

^a Mobile phase: 0.1 M phosphate buffer-acetonitrile (90:10), 1 ml/min.

れた結果、試料中の血清タンパクが担体やスパーサーに吸着されることなく、カラム外に排除されたことを示すものである。一方、オボムコイドやオボアルブミンを固定化したカラムからの血清タンパクの回収率が低かった。これは、血清タンパクが担体やスパーサーに吸着されたことに加えて、固定化されたオボムコイドやオボアルブミンの疎水性部分に吸着された可能性を示唆している。次に移動相のpHを4.5にしたときには、いずれのタンパク固定化カラムも血清タンパクの回収率が低い値を示した。これは血清タンパクの主成分である血清アルブミンの等電点が4付近であり、このpH条件では疎水性が最も高くなったことによるものと思われる。

以上の検討から、移動相のpHを選択することにより、アビジンカラムは血清タンパクを吸着することなくカラム外へ直ちに排除するので、血清試料を前処理することなく直接注入することが可能であることが判明した。

第3節 スパーサーの検討

スパーサーの長さやタンパクの固定化方法の違いによりカラムの性能が変わることはアフィニティークロマトグラフィーにおいて見られる現象である^{123, 124)}。そこでまずジサクシンイミドに10個のメチレン鎖を有するスパーサーを用いて、アビジンカラム作製と同じ操作方法によってカラムを作製して、これをアビジン（DSS-C₁₀）

カラムとした。このカラムにおける血清タンパクの回収率を表8に示した。アビジンカラムに比べて移動相のpHに関係なく血清タンパクの回収率が極めて低い結果を示した。これはスパーサーを長くすることにより、血清タンパクがシリカゲルやスパーサーに疎水性吸着したものと考えられる。

次に、アビジンカラムの光学分割能を評価した。モデル化合物としてケトプロフェン(KPF)を用いて、その生理食塩水溶液をアビジンカラムに $20\mu\text{l}$ 注入し、移動相条件として 0.1M リン酸緩衝液(pH2)/アセトニトリル=95/5を流速 1.0ml/min で分析したときのクロマトグラムを図30に示した。このアビジンカラムによりKPF光学異性体をベースライン分割できた。なお、第2章で述べたように、OVMカラム(ジサクシニミジルカルボネートによりオボムコイドをアミノプロピルシリカゲルに固定化したカラム)を用いた場合にもKPFの光学分割が可能であったが、メチレン鎖6個を有するDSSを介してオボムコイドを固定化したカラムでは、KPFは光学分割されず、DSS(メチレン鎖6個)をスパーサーとしてオボムコイドを固定化することは、KPFの光学分割には不適切であることがわかった。

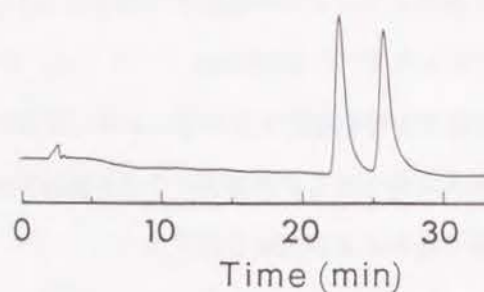


図30 アビジンカラムにケトプロフェン標準試料を注入したときのクロマトグラム
移動相： 0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH2)/アセトニトリル=95/5
流速： 1.0ml/min 、検出波長： 260nm

一方、移動相(0.1M リン酸緩衝液:pH2)中のアセトニトリル濃度とKPFのキャパシティーファクターについて調べた結果を図31に示した。アビジンカラム(DSSをスパーサー)と比べて、アビジンDSS- C_{10} カラムでのKPFの保持はメ

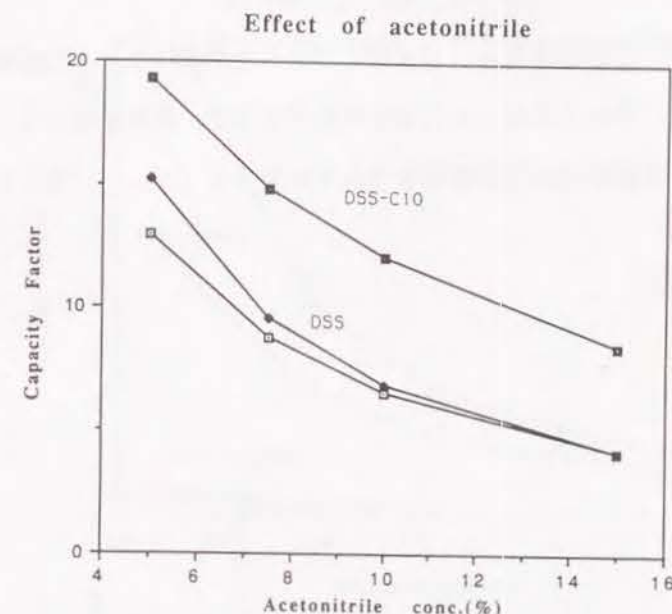


図31 アビジンカラムおよびアビジン-DSSカラムにおける移動相中のアセトニトリルとケトプロフェンのキャパシティーファクターについて
移動相： 0.1M リン酸緩衝液(pH2)

チレン鎖が増加することにより大きくなったが、光学分割はできなかった。またいずれのカラムについてもアセトニトリル濃度が増加するにつれ保持が小さくなり、逆相保持の特長を有していた。

次に、アビジンを固定化するスパーサーとしてDSSの代わりにジサクシニミジルカルボネート(DSC)をスパーサーとして用いたアビジンDSCカラムを作製した。この固定化方法は既にMiwaraが発表しているアビジンカラムの固定化法と同じものである¹¹⁶⁾。モデル化合物として、現在アルツハイマー治療薬として開発中であるE2020(図32にその構造式を示した)¹²⁵⁾を選び、これを生理食塩水に溶かして標準試

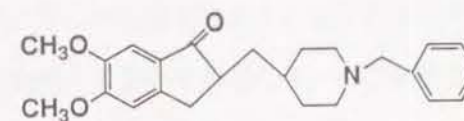


図32 E2020の構造式

料とした。アビジンDSCカラム、およびアビジンカラムに0.1M酢酸アンモニウム緩衝液(pH5)/アセトニトリル混液を移動相として、紫外吸収271nmで検出したときのE2020標準試料の分析例をそれぞれ図33(A)、(B)に示した。

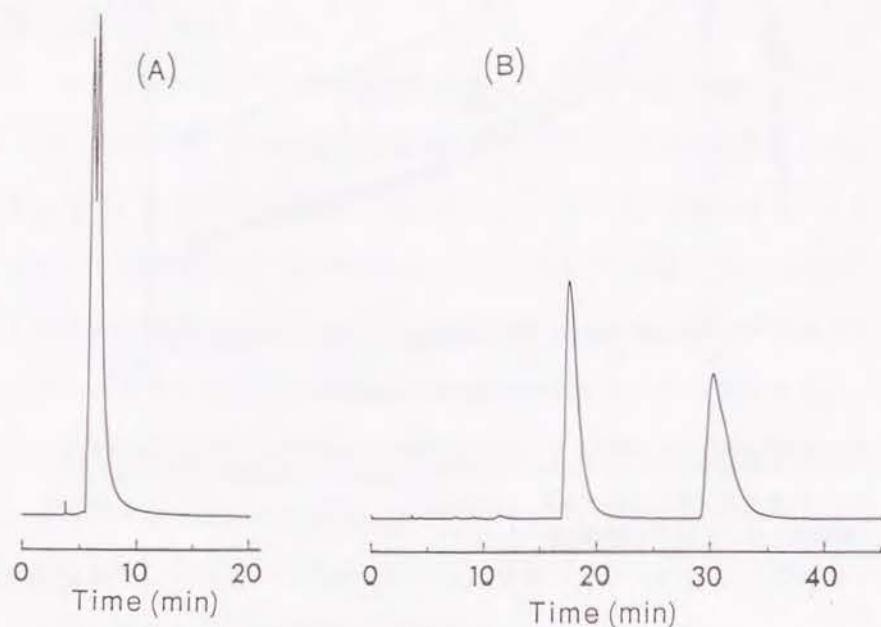


図33 アビジンDSCカラム(A)およびアビジンカラム(B)におけるE2020標準試料(100 μ g/ml)のクロマトグラム
移動相: 0.1M酢酸アンモニウム(pH5)
(A) アセトニトリル1%、(B) アセトニトリル5%
流速: 1.0ml/min、検出波長: 271nm

またこのときのアセトニトリル濃度とE2020のキャパシティーファクターとの関係について図34に示した。どちらのカラムもE2020を光学分割することができたが、アビジンDSCカラムは保持が弱く、分離係数もやや小さかった。

以上の検討からDSSをスペーサーとしてアビジンを固定化することは、光学分割の点から適していると考えられる。

Effect of Acetonitrile

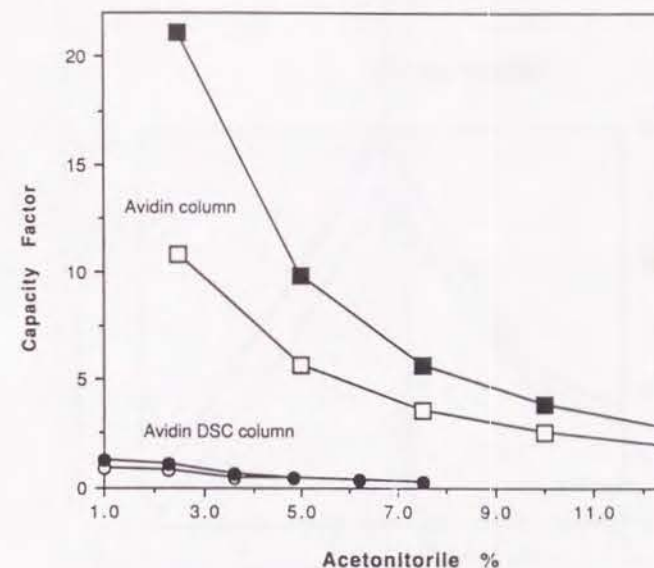


図34 移動相中のアセトニトリル濃度とキャパシティーファクターとの関係について
アビジンカラム(□、■)およびアビジンDSCカラム(○、●)
移動相: 0.1M酢酸アンモニウム緩衝液(pH5)
流速: 1.0ml/min、検出波長: 271nm

第4節 血清試料直接注入による光学異性体の分析

血清試料を前処理せずに直接注入して同時に光学分割も可能なカラムの使用は、分析時間の短縮や不安定な試料の分析に有効である。第3節における検討結果からアビジンカラムは、pH2あるいは7の移動相を使用したとき血清試料直接注入が可能で、同時に光学異性体の分離も可能であった。そこでまずKPF標準試料を用いて、移動相のpH(10%アセトニトリル、0.1Mリン酸緩衝液)とキャパシティーファクターについて検討した結果を図35に示した。移動相のpHが4.5付近で最も強い保持を示し、pH2あるいは7の移動相を用いた場合は、KPFの保持はやや弱いものの光学分割は充分可能であった。従って血清直接注入と光学分割を同時に行なうことは可能であると考えて、次にヒト血清にKPFを添加して、この血清試料直接注入の検討を行なった。移動相の組成0.1Mリン酸緩衝液/アセトニトリル=95/5(v/v)、流速1.0ml/min、検出波長260nmの条件下で、血清試料20 μ lを直接注入し

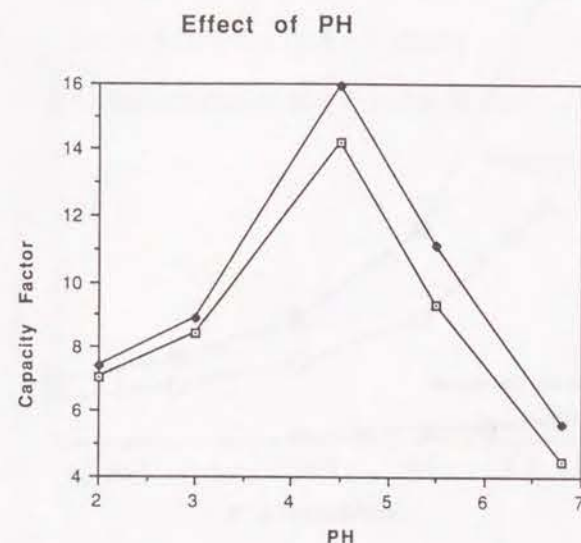


図3-5 移動相のpHとアビジンカラムにおけるケトプロフェンのキャパシティーファクターとの関係
移動相：0.1Mリン酸緩衝液/アセトニトリル=90/10
流速：1.0ml/min、検出波長：260nm

たときのクロマトグラムを図3-6に示した。移動相のpHが2 (A、B)、あるいはpHが7 (C、D) いずれのpHでも血清タンパクはアビジンカラムに保持されずに溶出し、一方KPFは保持され、しかも光学分割を行なうことができた。標準試料を同じ条件により分析したときに得られたKPFのピーク面積との比較から、血清試料直接注入によるKPFの回収率は、移動相のpH2のときで100.6%、pH7のとき98.7%と良好であった。この結果からアビジンカラムにより血清試料中の全KPF濃度を測定できた。また少なくとも血清1ml以上を注入した後も、カラム圧の上昇もなく、KPFの光学分割ができたことから、カラムの耐久性も充分満足できるものと考えられる。

アビジンカラムは血清試料を前処理せずに直接注入することが可能であり、血清成分と薬物を分離して、かつ同時に光学分割も可能なカラムである。また血清中の全薬物濃度を迅速に測定できるので光学異性体の体内動態研究に大きく寄与できるものと期待される。

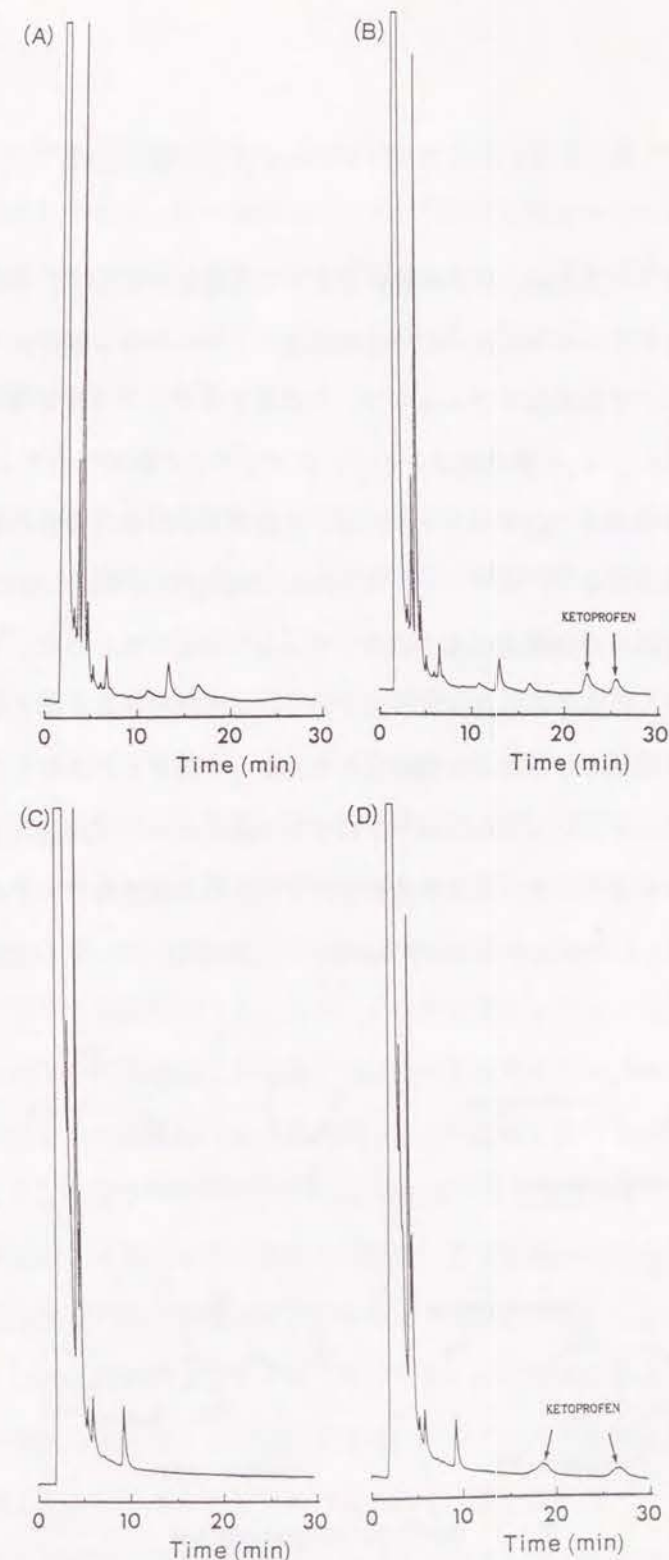


図3-6 血清試料20μlをアビジンカラムに直接注入したときのクロマトグラム
(A) (C) 血清ブランク、(B) (D) ケトプロフェン2.5μgを含む血清試料
移動相はアセトニトリル5%のリン酸緩衝液：(A) (B) pH2、(C) (D) pH7
流速：1.0ml/min、検出波長：260nm

第4章 アビジンカラムとオボムコイドカラムの保持挙動の比較

タンパク固定化カラムは、水系移動相条件下で広範な薬物に対し光学認識能を示すので、不斉炭素有する薬物の体内動態研究において特に有用な分析法である。現在市販されているタンパク固定化カラムとして、牛血清アルブミン (BSA) やヒト血清アルブミン (HSA)、 α_1 -酸性糖タンパク、オボムコイド固定化カラムがある^{3,7)}。特にオボムコイドカラム (OVMカラム) は、分離できる対象化合物の種類やカラムの耐久性の点で優れている^{3,4, 40, 43, 126)}。タンパク固定化カラムの優れた光学分割能は、タンパクの複雑な高次構造に強く依存していると考えられるので、不斉識別可能な薬物の種類やHPLC条件の最適化を予測することは困難である。第3章で作製したアビジンカラムとOVMカラムは共に鶏卵白より抽出した糖タンパクをサクシニミドを用いて活性化したアミノプロピルシリカゲルにアミド結合を介して固定化させており共通点が多い。そこで本章では光学異性体分析を行なうための基礎的データの収集を目的としてアビジンカラムとオボムコイドカラムの保持・分離挙動について比較検討を行った。

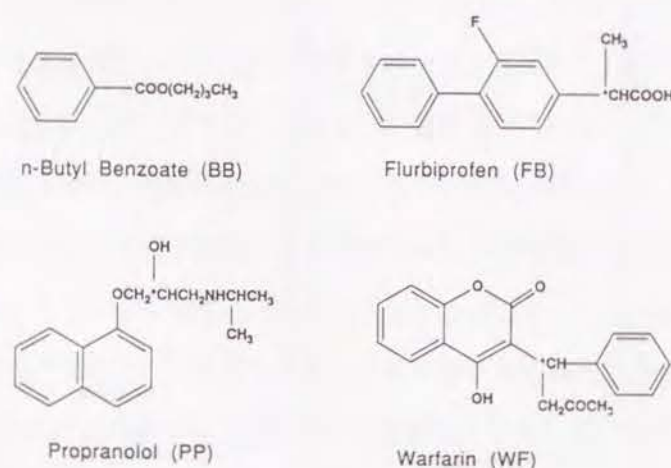


図37 検討に用いた化合物の構造式

なお本検討に際してモデル化合物として、酸性化合物であるフルルビプロフェン (F

B)、塩基性化合物であるプロプラノロール (PP) および弱酸性化合物であるワーファリン (WF) のそれぞれのラセミ体を用い、また不斉炭素を持たない中性のモデル化合物として安息香酸 n-ブチル (BB) を使用した。それらの構造式を図37に示した。

第1節 移動相のpHの影響

分析対象物であるイオン性薬物および固定相であるタンパクは多数の解離基を有することから、タンパク固定化カラムによる分析では、移動相のpHの影響を強く受けると考えられる¹²⁷⁻¹³⁰⁾。そこでアビジンカラムおよびOVMカラムにおける移動相のpHと、各モデル化合物の保持・分離挙動との関係について検討し、得られた結果を表9に示した。PPのpKaは約9.5であることから、検討した移動相のpH 2.8~6.7の範囲では常にPPは正電荷を有する。酸性化合物であるFB (pKa約4付近) とWF (pKa約5付近) は、移動相のpHがそのpKaより高くなるにつれて負イオン型の分率が高くなる。アビジンカラムおよびOVMカラムともに、移動相のpHが高くなるにつれてPPの保持は強くなったが、FBやWFはpH 4.4付近で最も保持が強くなった。しかし中性化合物であるBBの保持挙動は両カラム間で若干異なった。アビジンカラムでのBBの保持はあまり移動相のpHの影響を受けないが、OVMカラムでは移動相のpH 5付近でその保持が最も強くなった。各化合物のpKaを考慮すると、移動相のpH変化による各化合物の保持の変化は、化合物自身の電荷状態の変化よりむしろ固定相であるタンパクの影響が大きいと考えられる。アビジンおよびオボムコイド両タンパクともこのpH範囲2.8~6.7でイオン化状態が変わるアミノ酸残基として、プラスに荷電しうるヒスチジン (pK約6)、マイナスの電荷を持ちうるアスパラギン酸 (pK約3.7)、グルタミン酸 (pK約4.3) があり^{80, 117)}、移動相のpHによりこれらの電荷が変わり、さらにタンパクの構造も可逆的に変化すると考えられる^{131, 132)}。

アビジンカラムにおけるFBの光学分割は、移動相のpH 5.4以上ではほとんど

表9 アビジンカラムおよびオボムコイドカラムにおける移動相のpHと保持・分離挙動との関係
HPLC条件: カラム長さ150mm・カラム内径4.6mm、流速1.0ml/min
検出波長280nm、試料0.1mg/mlを10 μ l注入
カラム温度20-25℃、移動相は0.1Mのリン酸緩衝液/メタノール混液
メタノール濃度・1) 25%, 2) 15%, 3) 40%
k₁は1番目に、k₂は2番目に溶出する光学異性体のキャパシティーファクター
 α は分離係数(k₂/k₁)、Rsは分離度を表す

Avidin column														
PH	BB ¹⁾		FB ¹⁾		α	Rs	PP ²⁾		α	Rs	WF ²⁾		α	Rs
	k'	k'1	k'2	k'1			k'2	k'1			k'2	k'1		
6.7	2.05	3.04	4.40	1.45	3.00	3.58	4.05	1.13	0.87	4.21	4.97	1.18	1.27	
6.3	2.04	3.34	4.76	1.43	3.04	3.11	3.51	1.13	0.80	5.00	5.80	1.16	1.17	
5.9	2.02	4.16	5.77	1.39	2.96	2.44	2.79	1.14	0.85	6.73	7.52	1.12	0.93	
5.4	2.05	5.54	7.48	1.35	3.00	1.75	2.05	1.17	0.92	9.15	9.51	1.04	0.40	
4.4	1.96	7.00	8.88	1.27	2.39	0.87	0.99	1.14	0.61	10.43	12.37	1.19	1.61	
3.4	1.96	5.71	6.38	1.12	1.11	0.52	0.52	1.00	0.00	7.67	11.91	1.55	3.92	
2.8	1.95	4.06	4.06	1.00	0.00	0.37	0.37	1.00	0.00	7.22	12.61	1.75	4.40	

Ovomucoid column														
PH	BB ¹⁾		FB ²⁾		α	Rs	PP ¹⁾		α	Rs	WF ²⁾		α	Rs
	k'	k'1	k'2	k'1			k'2	k'1			k'2	k'1		
6.7	5.88	2.41	2.41	1.00	0.00	11.63	13.96	1.20	1.45	3.87	5.92	1.53	3.25	
6.3	5.85	3.17	3.37	1.07	0.49	9.95	11.84	1.19	1.43	5.48	9.75	1.78	4.54	
5.9	5.84	5.28	5.91	1.12	0.70	6.81	7.63	1.20	1.10	9.97	22.23	2.23	6.45	
5.4	7.09	9.58	10.49	1.10	0.66	3.81	3.99	1.05	0.42	19.29	49.99	2.59	8.49	
4.4	6.09	35.48	47.28	1.33	2.14	1.87	1.87	1.00	0.00	45.59	115.98	2.54	6.82	
3.4	5.45	27.87	36.11	1.30	1.86	1.30	1.30	1.00	0.00	23.82	47.26	1.98	5.50	
2.8	3.32	12.82	15.08	1.18	1.42	0.77	0.77	1.00	0.00	7.33	12.05	1.65	3.99	

表10 アビジンカラムおよびオボムコイドカラムにおける移動相中のメタノール濃度の影響
移動相のpHを6.1、その他の条件は表9と同じとした

Avidin column																
%	BB		FB			Rs	PP				Rs	WF				Rs
	k'	k'1	k'2	α	k'1		k'2	α	Rs	k'1		k'2	α	Rs		
5	11.32	-	-	-	-	-	4.80	5.23	1.09	0.60	-	14.21	16.31	1.15	1.16	-
10	7.13	14.86	25.71	1.73	5.32	-	3.49	3.87	1.10	0.67	-	8.95	10.26	1.15	1.23	-
15	4.57	8.83	14.53	1.68	4.09	-	2.72	3.06	1.13	0.79	-	5.30	6.04	1.14	1.12	-
20	3.03	5.72	8.95	1.56	3.67	-	2.23	2.54	1.14	0.85	-	3.46	3.91	1.13	1.00	-
25	2.00	3.78	5.69	1.50	3.21	-	1.83	2.08	1.14	0.85	-	2.31	2.58	1.12	0.84	-
30	1.29	2.51	3.67	1.46	2.98	-	1.45	1.65	1.14	0.80	-	1.66	1.82	1.10	0.67	-
35	0.83	1.59	2.29	1.44	2.38	-	1.19	1.34	1.13	0.71	-	0.99	1.07	1.09	0.48	-

Ovomucoid column																
%	BB		FB			Rs	PP				Rs	WF				Rs
	k'	k'1	k'2	α	k'1		k'2	α	Rs	k'1		k'2	α	Rs		
5	-	12.05	14.64	1.22	1.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	38.87	6.26	7.36	1.18	1.04	-	-	-	-	-	-	14.13	32.49	2.30	6.37	-
15	19.15	3.92	4.27	1.09	0.73	-	-	-	-	-	-	6.13	11.92	1.95	5.32	-
20	10.89	2.41	2.41	1.00	0.00	-	-	-	-	-	-	3.54	5.93	1.68	4.29	-
25	5.76	1.01	1.01	1.00	0.00	-	-	-	-	-	-	1.15	1.50	1.30	1.65	-
30	2.63	0.89	0.89	1.00	0.00	-	27.41	31.25	1.14	0.91	-	0.98	1.24	1.27	1.39	-
35	1.30	-	-	-	-	-	14.20	16.17	1.14	1.05	-	0.55	0.62	1.14	0.58	-
40	0.72	-	-	-	-	-	8.34	9.57	1.15	1.10	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	4.76	5.49	1.15	1.14	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	2.68	3.09	1.15	1.09	-	-	-	-	-	-

影響はなく、pHがそれ以下になるにつれて光学認識能が低下したことから、FBの保持の強いpHと光学認識能が高くなるpHとは一致しなかった。一方、OVMカラムでのFBの光学分割は、移動相のpHが4.4が最も良く、このpHで保持も強くなった。またPPの光学分割能に関しては、アビジンカラムでは移動相のpHが4.4以上ではほぼ一定であるが、pH4以下では光学認識能はなかった。OVMカラムでは移動相のpHを高くするにつれて分離が改善され、アビジンカラムと同様に低いpH領域では光学認識能がなくなった。検討したpH範囲(2.8~6.7)ではPPは正電荷を有することを考慮すると、PPの光学分割にアスパラギン酸残基やグルタミン酸残基のカルボキシル酸の解離が関与している可能性がある。WFについては、移動相のpHが5.4のときアビジンカラムでは光学認識能が最も低くなったが、OVMカラムでは逆に最も良く分離された。このように、化合物によって、移動相のpHと光学認識および保持挙動のプロファイルが異なることから、アビジンカラムもOVMカラムも複数の光学認識部位を有するものと考えられる^{46, 128)}。

第2節 移動相中の有機溶媒の影響

移動相中のメタノール濃度の影響について検討した結果を表10に示した。アビジンカラムおよびOVMカラムのいずれを用いた場合にも、検討した4種類の化合物の保持は、メタノール濃度が高くなるとともに小さくなった。このことは、これらの化合物の保持に疎水的相互作用が関与していることを示唆している。また各化合物の溶出順序はアビジンカラムではPP<BB<WF<FBの順であるが、OVMカラムでは全く逆であった。このことからタンパクと各化合物との静電的相互作用が両カラムにおける保持に関与していることが示唆された。即ち、アビジンは等電点が約10.5の塩基性タンパクであり¹¹⁴⁾、オボムコイドは等電点約4.5の酸性タンパクであるので⁸¹⁾、アビジンカラムは静電的に酸性化合物を保持しやすく、逆にOVMカラムは塩基性化合物を保持しやすいと考えられる。

FB及びWFの光学分割に関しては、両カラムともメタノール濃度が低くなるにつれて光学認識能が向上したが、PPについては両カラムともメタノール濃度の影響は小さかった。一般に水溶性のタンパクはその構造中に疎水性ポケットを有していることが知られている¹³³⁾ことから、アビジンカラムやOVMカラムにおけるFBとWFに対する光学認識部位では疎水的相互作用が大きく寄与しているものと思われる。一方、PPの光学認識に対してはメタノールによる影響はないが、保持に対して影響が認められたことから、両カラムともPPに対する光学認識部位とは別の吸着部位が存在していると思われる。

表11 アビジンカラムおよびオボムコイドカラムにおける移動相中の有機溶媒の種類と保持・分離挙動との関係

移動相のpH6. 1、メタノール濃度・1) 15%、2) 5%、3) 40%
その他の条件は表9と同じとした

Avidin column																				
	<u>BB¹⁾</u>					<u>FB¹⁾</u>					<u>PP¹⁾</u>					<u>WF¹⁾</u>				
	k'	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs			
Methanol	4.57	8.83	14.53	1.65	4.09	2.72	3.06	1.13	0.79	5.30	6.04	1.14	1.12							
Ethanol	2.51	4.83	6.09	1.26	1.52	2.02	2.23	1.10	0.68	3.49	3.90	1.12	0.95							
1-Propanol	1.70	2.68	2.83	1.05	0.45	1.58	1.58	1.00	0.00	2.29	2.29	1.00	0.00							
Acetonitrile	1.30	2.44	2.44	1.00	0.00	1.36	1.36	1.00	0.00	1.36	1.36	1.00	0.00							

Ovomucoid column																				
	<u>BB¹⁾</u>					<u>FB²⁾</u>					<u>PP³⁾</u>					<u>WF¹⁾</u>				
	k'	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs			
Methanol	19.15	12.05	14.61	1.22	1.02	8.34	9.57	1.14	1.10	6.13	11.92	1.95	5.32							
Ethanol	7.74	6.86	8.12	1.19	1.03	1.37	1.37	1.00	0.00	2.24	4.07	1.82	4.46							
1-Propanol	1.64	3.48	3.48	1.00	0.00	0.13	0.13	1.00	0.00	1.14	1.14	1.00	0.00							
Acetonitrile	2.83	6.10	7.27	1.19	1.31	0.51	0.61	1.18	0.79	1.20	1.53	1.28	1.77							

次に、移動相中の有機溶媒の種類と保持・分離との関係について検討した結果を表11に示した。添加したアルコールのアルキル鎖が長くなるにつれて、検討した4種類の化合物の両カラムにおける保持値及び光学分割能はいずれも低下した。これはOVMカラムに関してWainerらが報告した結果¹²⁶⁾と同じであり、有機溶媒のアルキル鎖はタンパクと溶質の相互作用を妨げたり、分子量の大きな有機溶媒を加えることに

よりタンパクのコンフォメーションが変化したものと考えられる^{134, 135)}。また溶出力の強さは、アビジンカラムではメタノール<エタノール<1-プロパノール<アセトニトリルの順で、OVMカラムではメタノール<エタノール<アセトニトリル<1-プロパノールの順であった。両カラム間でアセトニトリルの溶出力が少し異なった。

第3節 移動相中の塩の影響

移動相中のリン酸緩衝液の塩濃度の影響について検討した結果を表12に示した。両カラムにおいて塩濃度10~300mMの範囲では、FB、PP、WFいずれも分離にほとんど影響がなかった。このことから塩濃度は、アビジンカラムやOVMカラムでの光学認識能において主要な要因ではないと考えられる。またアビジンカラムでの保持に関して、PPやBBは塩濃度の影響をほとんど受けなかったが、FBとWFは塩濃度が10~100mMへ増加するにつれ保持は減少した。一方、OVMカラムでは、BBの保持は塩濃度の減少と共に小さくなったが、逆にFBとPPの保持は塩濃度減少につれて増大した。また、OVMカラムでのWFの保持はアビジンカラムでの保持と同様に塩濃度10~100mMでは塩濃度増加と共に減少して、100mM以上では逆に塩濃度増加により保持も増大した。これらの結果から両カラムにおける溶質の保持にイオン交換効果や塩析効果¹³⁶⁾のようなクーロン相互作用が影響していると考えられる。また、両カラムにおける光学分割の挙動と保持の挙動が一致しなかったことから、固定化タンパク分子中の保持に関わる部位には光学認識能を有する部位と光学認識能を示さない部位の2種類存在する可能性がある。

次に、移動相に添加した緩衝塩のアニオン種と保持・分離との関係について検討した結果を表13に示した。アビジンカラムおよびOVMカラムともにリン酸緩衝液に比べてクエン酸緩衝液では4種類の化合物の保持はいずれも減少した。また酢酸緩衝液では両カラムでのWFの保持は強くなり、BBとPPの保持は増大した。一方、FBはアビジンカラムでの保持は減少し、OVMカラムでの保持は増大した。このことから緩衝

表12 アビジンカラムおよびオボムコイドカラムにおける移動相中のリン酸緩衝液濃度の影響
移動相のpH 6.0、メタノール濃度・1) 20%、2) 10%、3) 40%
その他の条件は表9と同じとした

Avidin column													
mM	<u>BB</u> ¹⁾		<u>FB</u> ¹⁾			<u>PP</u> ¹⁾				<u>WF</u> ¹⁾			
	k'	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs
10	2.99	11.28	16.73	1.48	3.85	1.83	2.04	1.12	0.64	7.05	8.15	1.16	1.42
50	2.98	8.85	13.19	1.49	3.87	2.33	2.63	1.13	0.84	4.00	4.59	1.15	1.20
100	3.01	5.87	9.13	1.56	4.03	2.15	2.44	1.14	0.90	3.57	4.01	1.12	1.03
200	3.24	5.90	9.32	1.58	3.98	2.07	2.36	1.14	0.93	3.61	3.98	1.10	0.88
300	3.47	6.13	9.79	1.60	4.30	2.03	2.32	1.14	0.93	3.79	4.13	1.09	0.78

Ovomucoid column													
mM	<u>BB</u> ¹⁾		<u>FB</u> ²⁾			<u>PP</u> ³⁾				<u>WF</u> ¹⁾			
	k'	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs
10	10.33	24.10	28.51	1.18	0.90	11.94	13.82	1.16	0.83	5.96	11.59	1.94	5.54
50	10.58	9.10	10.75	1.18	1.00	11.16	12.91	1.16	1.25	4.62	8.70	1.88	4.55
100	10.93	6.76	8.01	1.18	1.04	7.61	8.74	1.15	1.12	4.82	8.85	1.84	4.58
200	13.01	4.57	5.36	1.17	1.05	5.50	6.21	1.13	0.87	5.81	11.41	1.96	5.58
300	14.10	3.16	3.64	1.15	0.96	-	-	-	-	6.07	11.98	1.98	5.66

表13 アビジンカラムおよびオボムコイドカラムにおける移動相中の緩衝塩のアニオン種と保持・分離挙動との関係
移動相のpH 6.1、メタノール濃度・1) 20%、2) 10%、3) 40%
その他の条件は表9と同じとした
* N. E. : 試料注入後100分以内に溶出せず

Avidin column													
	BB ¹⁾		FB ¹⁾			PP ¹⁾				WF ¹⁾			
	k'	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs
Phosphate	3.11	7.11	10.84	1.53	4.07	2.23	2.52	1.13	0.83	4.42	5.01	1.13	1.10
Citrate	3.07	4.96	7.34	1.48	3.09	2.14	2.40	1.12	0.81	3.36	3.64	1.08	0.70
Acetate	2.17	6.36	7.84	1.23	2.21	1.31	1.44	1.08	0.54	6.00	6.72	1.12	1.12
Borate	2.89		N.E.*			0.34	0.34	1.00	0.00		N.E.*		

Ovomucoid column													
	BB ¹⁾		FB ²⁾			PP ³⁾				WF ¹⁾			
	k'	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs
Phosphate	10.49	8.86	10.39	1.17	0.78	10.22	11.76	1.15	1.15	4.00	5.80	1.45	3.95
Citrate	10.47	6.75	8.05	1.19	0.96	6.92	7.89	1.14	1.05	3.87	5.57	1.44	3.92
Acetate	9.64	13.12	15.03	1.15	0.80	5.11	5.78	1.13	0.99	5.14	7.79	1.52	4.90
Borate	12.69	10.39	13.01	1.25	1.10	1.33	1.33	1.00	0.00	5.95	9.79	1.64	5.73

液のアニオン種は薬物の保持機構に関与し、その原因として両タンパクのコンフォメーションに影響を与えたり薬物とアニオン種とがタンパク結合部位を競合した結果かもしれない。次に、ほう酸緩衝液を使用した場合、アビジンカラムではPPの保持は減少し、FBとWFの保持は大きく増大して、保持時間は100分以上であった。一方、OVMカラムでは、検討したアニオン種の中でほう酸緩衝液を用いた場合にWFとBBの保持は最も大きくなった。これは、ほう酸はシス配置のジオール基と複合体を形成することが知られていることから、タンパク表面の糖との相互作用の結果と思われる¹³⁷⁾。しかしほう酸緩衝液からリン酸緩衝液に戻すことにより、両カラムの特性も初期状態に戻ることからこれら種々のアニオン種によるカラム性質の変化は可逆的であることが判かった。

第4節 カラムの耐久性とアビジン-ビオチン複合体について

タンパク固定化カラムをHPLC用光学分割カラムとして日常的に汎用するためには、認識能を有することに加えて、耐久性も必要である。アビジンおよびオボムコイドは温度に対して安定であり、かつ広範なpH領域でも使用可能である^{138, 139)}。また両タンパクとも凍結乾燥した粉末状態で、温度45℃加湿75%の苛酷条件下で3か月間保存後も性状、溶状、吸光度、水に溶かしたときのpHなどに変化は認められなかった。さらにタンパクを化学的に安定なアミド結合を介してシリカ上に固定化することにより、タンパクの構造が安定化されている¹⁴⁰⁾。KirklandらはOVMカラムと α_1 -酸性糖タンパクカラムとを比較検討した結果、OVMカラムは耐久性に非常に優れていると報告し⁴³⁾、WainerらもOVMカラムを長期間種々の移動相条件で使用したが、カラムは安定であったと述べている¹²⁶⁾。そこで著者はこのOVMカラムとアビジンカラムを前述の種々の移動相条件下で使用した後の保持・分離について、初期状態と比較した結果を表14に示した。種々の有機溶媒や緩衝液を使用したにも関わらず、初期状態と比べ各化合物の溶出挙動にほとんど影響がなかった。即ち、アビジ

ンカラムは、OVMカラムと同程度の耐久性があると言える。

表14 アビジンカラムおよびオボムコイドカラムの耐久性

移動相のpH6. 1、メタノール濃度・1) 25%、2) 15%、3) 40%、4) 20%
その他の条件は表9と同じとした

	<u>BB</u>		<u>FB</u>				<u>PP</u>				<u>WF</u>			
	k'		k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs
Avidin column:	1)		1)				2)				2)			
initial	2.00		3.78	5.69	1.50	3.21	2.72	3.06	1.13	0.79	5.30	6.04	1.14	1.12
after 200 injections	2.07		3.87	6.04	1.56	3.41	2.83	3.14	1.11	0.74	5.50	6.23	1.13	1.08
Ovomucoid column:	1)		2)				3)				4)			
initial	5.76		3.92	4.27	1.09	0.73	8.34	9.57	1.15	1.10	3.54	5.93	1.68	4.29
after 200 injections	5.39		3.94	4.07	1.03	0.31	8.86	10.10	1.14	1.34	3.28	5.50	1.68	4.43

アビジンはビオチンと解離定数 1.0×10^{-15} M という極めて安定な複合体を形成することが知られている¹¹⁵⁾。そこで、アビジンカラムの保持・分離能に対するビオチンの影響を検討するため、ビオチンを pH 6.5 のリン酸緩衝液に溶かし 0.22 mg/ml とし、アビジンカラムにこのビオチン溶液を流速 1.0 ml/min で 5 時間流し続けた。その後アビジンカラムの性能評価を行なった結果を表 15 に示した。

表15 アビジンカラムにおけるビオチン結合の影響

移動相の pH 6. 1、メタノール濃度 20%、その他の条件は表9と同じとした

	<u>BB</u>					<u>FB</u>					<u>PP</u>					<u>WF</u>				
	k'	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs	k'1	k'2	α	Rs			
Before	3.03	5.72	8.95	1.56	3.67	2.23	2.54	1.14	0.85	3.46	3.91	1.13	1.00							
After	0.98	1.35	1.51	1.12	0.64	1.78	1.78	1.00	0.00	1.42	1.42	1.00	0.00							

各化合物の保持は極めて弱く、PP 及び WF に対する光学認識能はなくなり、FB に対する光学認識能も著しく低下した。このようにアビジンにビオチンを結合させることによりアビジンカラムの性能が大きく劣化したが、FB に対する光学認識能は残っていたことから、PP や WF に対する光学認識部位と FB に対する光学認識部位は異なるものと考えられる。また、アビジンにおけるビオチンの結合部位にトリプトファン残基が

存在することから¹⁴¹⁾、アビジンカラムに対する PP や WF の結合部位はアビジンのトリプトファン残基周辺であると考えられる。あるいはビオチンの結合に伴ってアビジンのコンフォメーションが大きく変化し¹³⁹⁾、その結果各化合物の光学認識部位も変化した可能性もある。なお、アビジンとビオチンの結合は極めて強固であるので、ビオチンを結合させたアビジンカラムを初期の状態に戻すことはできなかった。

FB、PP 及び WF の典型的なクロマトグラムを図 38 (アビジンカラム) および図 39 (OVMカラム) に示した。

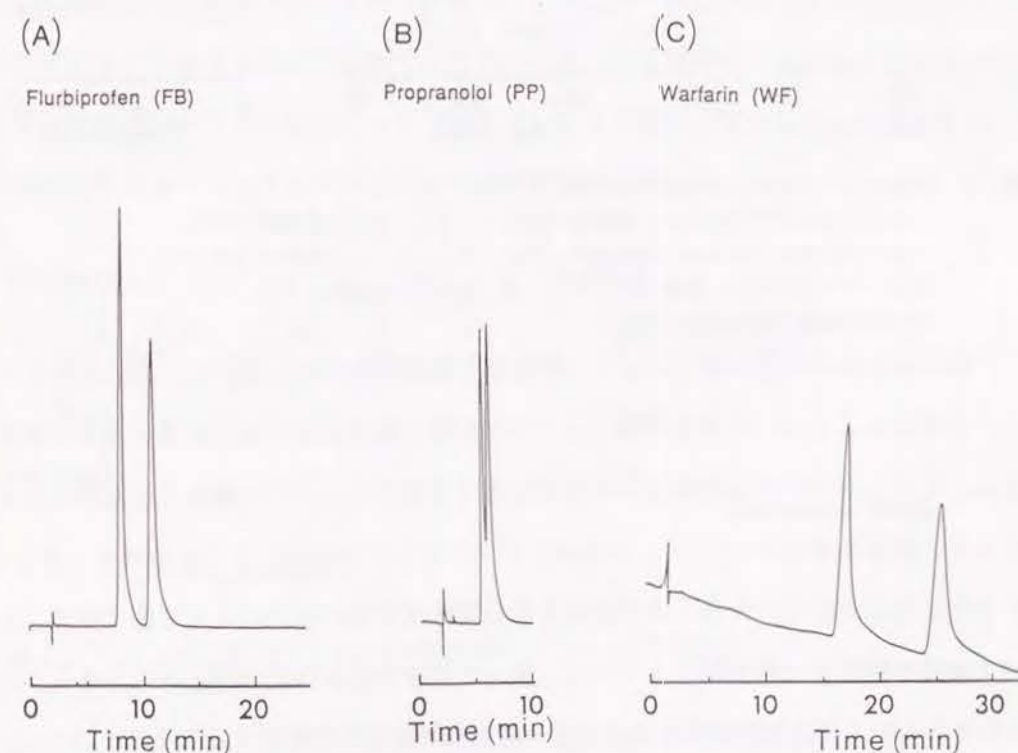


図38 アビジンカラムでの光学分割例

(A) フルルビプロフェン、移動相の pH 6.8、メタノール濃度 25%
(B) プロプラノロール、移動相の pH 5.4、メタノール濃度 15%
(C) ワーファリン、移動相の pH 3.4、メタノール濃度 15%
その他の条件は表9と同じとした

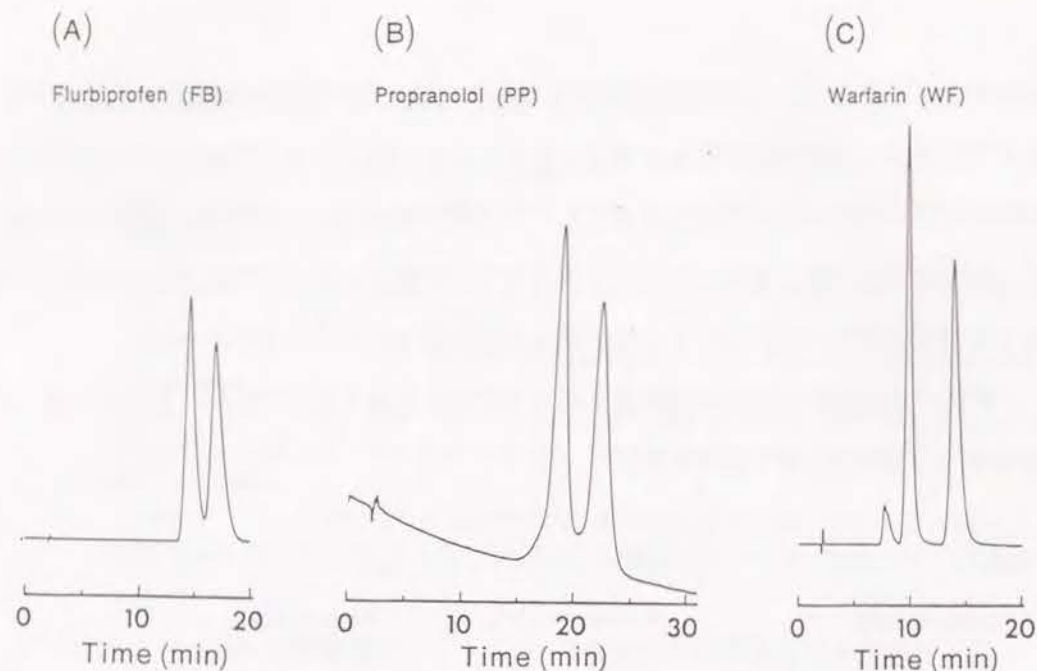


図3-9 オボムコイドカラムでの光学分割例

(A) フルルビプロフェン、移動相のpH 4.8、メタノール濃度20%

(B) プロプラノロール、移動相のpH 6.7、メタノール濃度45%

(C) ワーファリン、移動相のpH 6.7、メタノール濃度15%

その他の条件は表9と同じとした

一般に固定相の特性の違いにより分析対象化合物が変わることから、固定化するタンパクを変えることは、水系移動相により光学分割可能な薬物の種類が多くなると期待できる。しかしタンパクは複雑な高次構造を有するのでタンパク-薬物の相互作用を解明することは容易ではない¹⁴²⁾。さらにアビジンカラムやOVMカラムの場合、タンパクを化学的に固定化した後、有機溶媒を含む緩衝液を高い圧力によって流すので、タンパク構造の解析を一層困難にしている。従って薬物の吸着部位の同定はもちろん、これらのカラムにより分離可能な化合物構造や最適分離条件の予測をするに至っていない。しかし移動相のpH、有機溶媒および緩衝液などを変えることにより、アビジンカラムやOVMカラムの光学認識能や保持に大きな影響を及ぼすことが明かとなった。そして両カラムとも主な相互作用は疎水力と静電力であり、また複数の光学認識部位が存在していると思われる。さらにアビジンとオボムコイドは、分子量や等電点など性質が異なるにも関わらず、両カラム間において保持や分離挙動にいくつか共通点も見られた。また両カラムとも実用的な耐久性を有しており、日常の分析に支障はないと考えられる。

第5章 アビジンカラムを用いたカラムスイッチングシステムの検討

第1節 オボムコイドカラムとの組み合わせ

フレカイニド (FLC) は、電気生理学的にクラス Ic 型の特性を有し、動物実験では種々の薬物や冠動脈結紮により誘発した心室性不整脈モデル症状を静脈内投与で抑制することが確認されている¹⁴³⁾。また日本での臨床試験の結果、頻脈性不整脈に対して経口投与で有用性が認められている¹⁴⁴⁾。FLCの構造は図4-0に示したように、不斉炭素を1つ有する塩基性薬物でありラセミ体として用いられている。このFLCとその主代謝物の一つであるME-I (図4-0) をモデル化合物として、アビジンカラムを用いたカラムスイッチングシステムの検討を行なった。

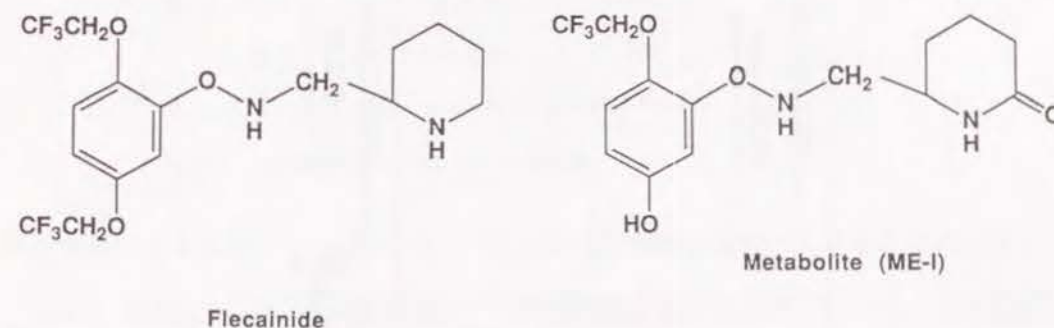


図4-0 フレカイニド (FLC) とその主代謝物 (ME-I) の構造式

1-1 アビジンカラムへの血清試料直接注入による分離定量

アビジンカラムは、第3章で既に述べたように移動相のpHが2あるいは7のとき血清タンパクの回収率が良好なので、除タンパクなどの前処理することなく血清試料直接注入可能なHPLC用カラムである。担体であるシリカ表面に化学的に固定化されたアビジンは、極性が高くかつ嵩高いので、このアビジンカラムに導入された試料中の血清タンパクは、シリカ細孔内に侵入することなく、また固定相表面で疎水的相互作用を

持つことなく排除されされる。これに対して低分子薬物はアビジン分子中の疎水ポケットやスパーサーである炭素鎖などに保持されると考えられる。さらに第4章で報告したように水系移動相での光学分割も可能である。そこで移動相として0.1Mリン酸緩衝液(pH7)/アセトニトリル=95/5(v/v)混液を1ml/minの流速で使用した時に、ヒト血清ブランク20 μ lおよびヒト血清にFLCとME-Iを添加した試料20 μ lをアビジンカラム(長さ250mm・内径4.6mm)に直接注入してUV298nmで検出したときのクロマトグラムを図41(A)、(B)にそれぞれ示した。血清成分の妨害を受けることなくFLCとME-Iは相互に分離された。この時得

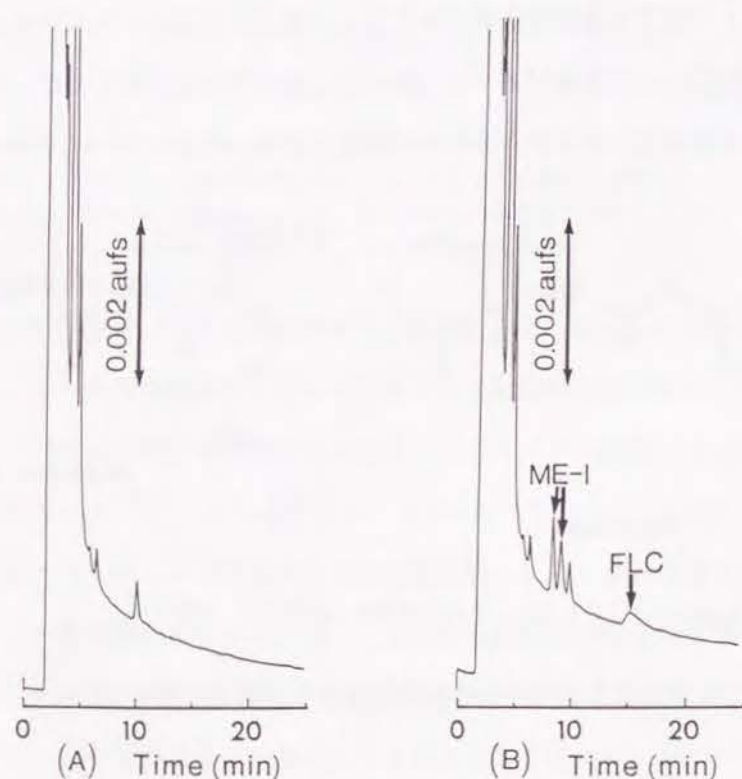


図41 アビジンカラムに(A)血清ブランク、(B)FLCとME-Iそれぞれ5 μ g/mlを含む血清試料を注入して得られたクロマトグラム

HPLC条件、アビジンカラム：長さ250mm・内径4.6mm、

移動相：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)/アセトニトリル=95/5、

流速：1.0ml/min、検出波長298nm、注入量：20 μ l

られたFLCのピーク面積およびME-Iの二本のピーク面積の和と生理食塩水にこれら薬物を溶解した試料を注入して得られたピーク面積との比較から算出した回収率を表16に示した。FLCとME-Iともに三種の異なった濃度でいずれも回収率が95%

表16 血清試料からのFLCおよびME-Iの回収率 (5回繰り返し測定)

	Conc. (μ g/ml)	Recovery	C.V.*
FLC	2.5	94.5 %	8.7 %
	10.0	99.5 %	1.9 %
	20.0	101.2 %	2.0 %
ME-I	2.5	95.3 %	2.0 %
	10.0	99.5 %	1.8 %
	20.0	103.2 %	1.3 %

* C.V. means coefficient of variation.

以上であったことから、このアビジンカラムに血清試料を直接注入することによって、2.5~20 μ g/mlの範囲で血清中の全薬物濃度を測定可能であった。さらにME-Iは図41(B)に示したように、血清試料を前処理せずアビジンカラムに直接注入して光学分割することができた。このときのME-Iの保持時間と光学分割の再現性について、血清試料を繰り返し注入7回行なったときの結果を表17に示した。保持時間とピーク面積比の相対標準偏差は1.0%以下と良好であり、またこのときのME-Iの検出限界はシグナル/ノイズ比(S/N)=3で絶対注入量として3ng、定量限界は10ng(0.5 μ g/ml)であった。一方、第3章の結果からアビジンカラムに血清試料を直接注入する際の移動相のpHは2あるいは7であるが、このpHではFLCは光学分割されなかったため、血清にFLCを標準添加して光学異性体の合計量として検量線を作成して、その結果を図42に示した。血清中の濃度0.5~25 μ g/m

1の範囲で相関係数0.997の良好な直線性を得た。また、このアビジンカラムは表17に示したように再現性に優れており、しかも血清試料を少なくとも合計5mlまで繰り返し直接注入してもカラム効率の低下やカラム圧の上昇は認められなかった。

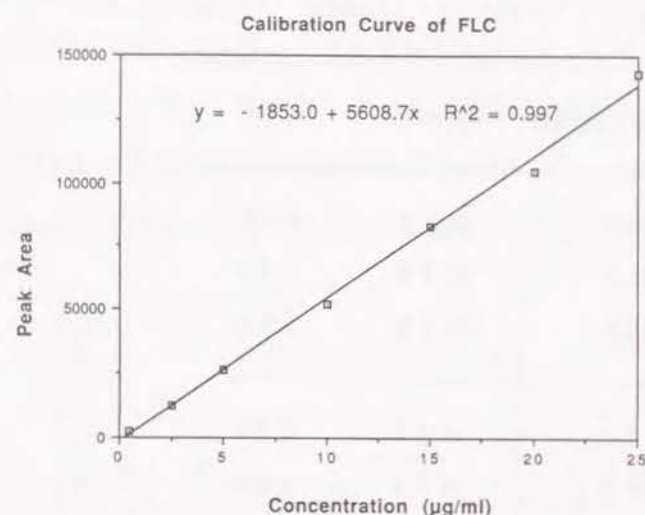


図4-2 ヒト血清にFLCを添加してアビジンカラムでの分析により得られた検量線
横軸：FLCの濃度、縦軸：FLCのピーク面積

表1-7 アビジンカラムでのME-Iの保持時間と光学分割の再現性

(N = 7)

	t_1^* (min)	t_2^* (min)	Peak area ratio	R_s^{**}
Mean	8.52	9.22	49.92 : 50.08	1.13
C.V.	0.4 %	0.4 %	0.9 %	2.0 %

* t_1 , or t_2 , means the retention time of the first, or second, enantiomer of ME-I to be eluted, respectively.

** R_s means the resolution of ME-I enantiomers.

1-2 オンライン化によるオボムコイドカラムでの光学分割

直接注入法により血清試料中のFLCの光学分割を行なうために、まずアビジンカラムによって血清成分や代謝物と分離して総濃度を定量した後、FLCを含む画分を水系移動相で光学分割が可能な第二のカラムにオンラインで送り込み、光学異性体間の濃度比を求めるオンラインHPLCシステムの開発を検討した。OVMカラムは芳香環を有する光学異性体の分離に有用であり、種々の光学異性体薬物が分離できて、かつ耐久性に優れていることが報告され^{3,4, 40, 43, 126)}、日本国内はもちろん欧米で市販され高い評価を得ている。そこでFLCの光学分割を行なうため、このOVMカラムを用いることにした。第4章で述べたように、OVMカラムの光学分割能は移動相のpHや有機溶媒によって大きく影響され、またアビジンカラムの光学分割も同様に移動相組成に依存する。従って、アビジンカラムとOVMカラムをカラムスイッチングによりオンライン化するためには、第1章で開発した移動相変換システムを組み込んだカラムスイッチング法が有用である。そのシステムを図4-3に示した。

[HPLC条件]

カラムC1 (血清成分分離用) : アビジンカラム (長さ25cm・内径4.6mm)

カラムC2 (濃縮用) : OVMミニカラム (長さ10mm・内径4.6mm)

カラムC3 (光学分割用) : OVMカラム (長さ15cm・内径4.6mm)

検出波長 : 検出器1、2ともに298nm

移動相1 : 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.5) / アセトニトリル = 95 / 5 (v / v)

移動相2 : 0.001Mリン酸緩衝液 (pH8)

移動相3 : 0.02Mリン酸緩衝液 (pH4.8) / アセトニトリル = 98 / 2 (v / v)

流速 : ポンプ1 ; 1.0ml/min、ポンプ2 ; 4.0ml/min、ポンプ3 ;

1.0ml/min

希釈倍率：希釈管の抵抗（長さ、内径）を変え、移動相2により7倍希釈とした

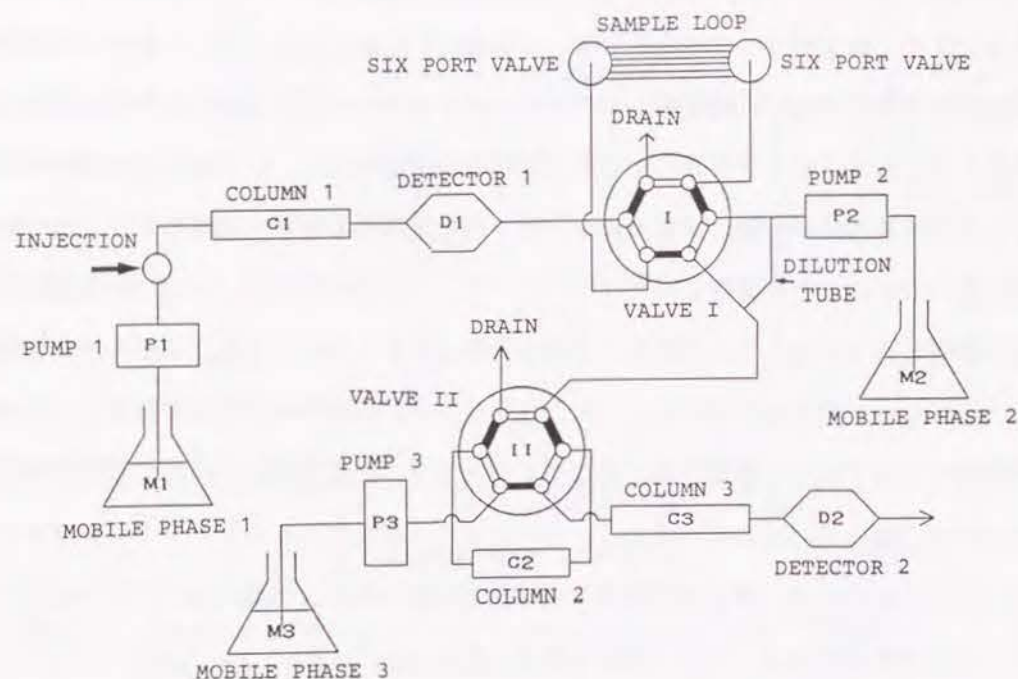


図4.3 血中FLCとME-Iの分析に使用したカラムスイッチングシステム

このシステムでは濃縮カラムと希釈管が重要な機能を果たしている。アビジンカラムから溶出されるFLCを含む画分は、移動相2により希釈されながら濃縮カラムに送られて、そこでFLCが保持・濃縮される。従って移動相2はOVMミニカラムに対してFLCの保持を強くする組成である必要がある。

このカラムスイッチングシステムにおいてOVMカラムでの分離効率を向上させるためには、濃縮カラム上でのFLCの拡散を最小限に抑えること、即ちFLCを濃縮カラムの入口端部分にできるだけ局在化させることが必要である。そこでOVMミニカラム以外に濃縮カラムとして適したカラムがあるか否かの検索を行った。なお、カラムの大きさ（長さ10mm・内径4.6mm）および充填剤の粒子径（ $5\mu\text{l}$ ）、充填剤製

造メーカーは同一のものを使用した。まずヌクレオシル100-CNを用いたとき、検出器2でのFLCのピークはOVMミニカラムを用いたときに比べて小さくなった。これはシアノプロピル基（CN基）に対するFLCの保持が弱く十分に保持されなかったためであった。次にヌクレオシル300-C4を濃縮カラムとして用いた。この時検出器2でのFLCのピークは非常にブロードであり、光学分割ができなかった。これはC4カラムでのFLCの保持が弱いので濃縮の際、C4カラム内でFLCが拡散したためであると考えられる。次にヌクレオシル100-SA、ヌクレオシル100-C₆H₅（フェニル基）およびヌクレオシル100-C8を濃縮用カラムとして用いた。しかし、いずれも検出器2でFLCは検出されなかった。以上の結果から濃縮カラムは目的の試料を効率良く保持させることと、同時に目的の試料を容易に溶出できなければならない。従ってカラム2とカラム3の固定相は同じであることが望ましく、濃縮カラムとしてはOVMミニカラムが最適であると考えられた。

次に、ヒト血清にFLCとME-Iを添加した試料を前処理操作せず直接アビジンカラムに注入してFLCを分離定量後、カラムスイッチングを行いFLCをOVMカラムによって光学分割した例を図4.4（A）に示した。このとき検出器2におけるFLCの検出限界はS/N比3で絶対注入量として30ngであった。検出器1でのFLCの検出限界がラセミ体で6ng（S/N=3）であったことから、光学分割後の検出器2での感度は約20%に低下したことになる。これはアビジンカラムから溶出するFLCを濃縮カラムに保持させて、次にOVMカラムに送り出す一連のカラムスイッチング操作中での拡散等の影響によるものと考えられた。そこで第1章で述べたマイクロアOVMカラムをカラム3として用いることによってFLCエナンチオマーの検出感度の向上を図った。このときの結果を第1章図1.2に示した。OVMカラムの内径を小さくするにつれてFLCのピークが大きくなったが同時にテーリングも生じた。これは内径の大きな濃縮カラム（内径4.0mm）から内径の小さなOVMカラム（内径1.0mm）にFLCを送り込む際に拡散が生じ、さらに移動相3の流速が遅いので拡散の影響が顕著になったことが原因であろうと思われる。この拡散現象を小さくするためには濃縮カラ

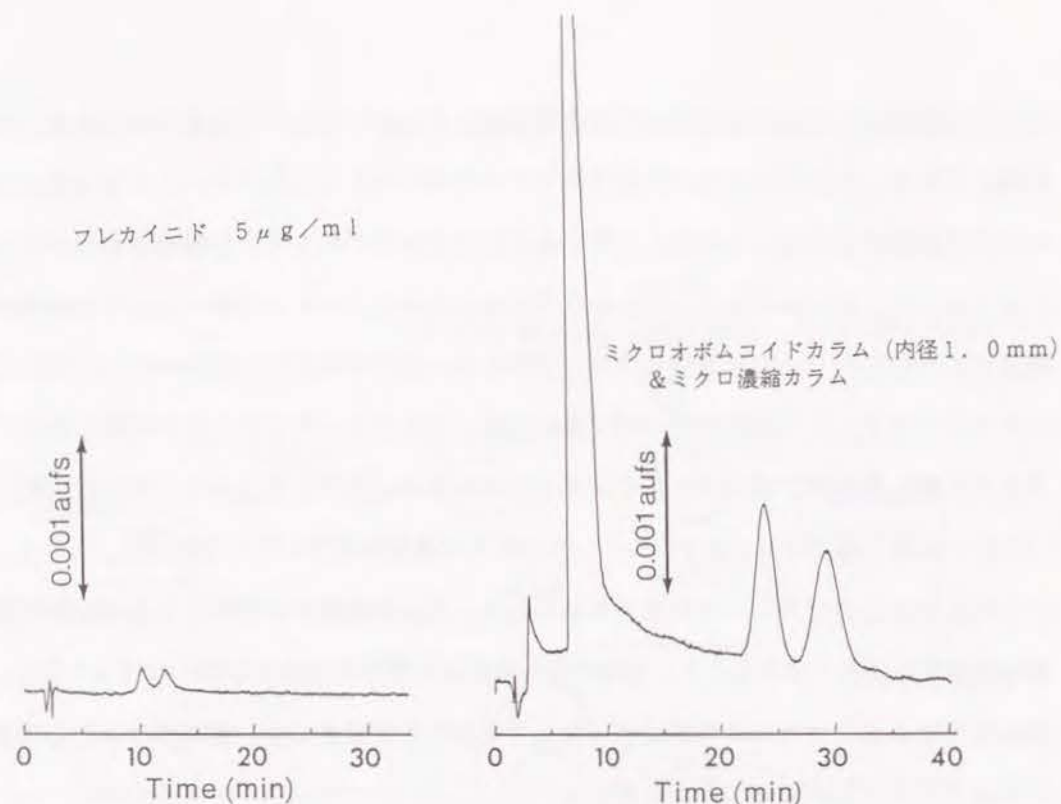


図4-4 カラムスイッチング後、オボムコイドカラムにより血中のFLCを光学分割して検出器2で得られたクロマトグラム
(A) 内径4.0 mm・長さ10 mmの濃縮カラムと内径4.6 mm・長さ150 mmのオボムコイドカラムを使用、(B) 内径2.0 mm・長さ35 mmの濃縮カラムと内径1.0 mm・長さ150 mmのオボムコイドカラムを使用
HPLC条件：本文参照

表1-8 カラムスイッチングシステムによる血中FLCのミクロオボムコイドカラムでの保持時間と光学分割の再現性 (7回繰り返し測定)

	t_1 (min)	t_2 (min)	Peak area ratio	N_1^*
Mean	24.49	29.68	50.14 : 49.86	1123
C.V.	1.7 %	2.0 %	0.6 %	4.2 %

* N_1 means the theoretical plate number for the first-eluted FLC enantiomer.

ムの内径をできるだけ小さくすることが必要である^{73, 75)}。しかし濃縮カラムの内径が小さくなるほどカラム圧が上昇するので、移動相2の流速を遅くする必要があり、その結果分析時間の増大につながる。そこでこれらを考慮して、濃縮カラムの内径を2.0 mmとし、移動相2の流速を1.0 ml/minに設定した。そのときの結果を図4-4 (B)に示した。対称性の良いピーク形状が得られ、このときのFLCの検出限界は絶対注入量として $S/N=3$ で6 ngであり図4-4 (A)の5倍となった。次にFLCとME-Iをヒト血清に添加した血清試料 (FLC: $2.5 \mu\text{g/ml}$) $20 \mu\text{l}$ をアビジンカラムに直接注入して、FLCをME-Iや血清成分と分離定量後、図4-4 (B)と同じシステムにより光学分割を行なう一連の操作を7回繰り返し行なった結果を表1-8に示した。FLCエナンチオマーの溶出時間およびピーク面積比ともに再現性の良い結果が得られた。このように、本法は血清試料の前処理操作が不要であり、短時間に感度良く血清試料中のFLCとその代謝物ME-Iの光学異性体を分析することができた。また2種類の固定化タンパクカラムを用いることによって、血清試料を前処理することなく、より広範な光学異性体薬物の分析が可能になったと考えられる。

第2節 アビジンカラムと質量分析装置の連結

2-1 アビジンカラムによるE2020の光学分割

ピペリジン誘導体であるE2020 (構造式は図3-2)は、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) の活性を*in vivo*で阻害し ($IC_{50}=5.3 \text{ nM}$)、ラットを用いた実験でもAChE活性を濃度依存的に阻害した¹⁴⁵⁾。またラットにE2020を経口投与したところ脳内のアセチルコリン (ACh) 濃度の増加が認められた¹⁴⁶⁾。AChは重要な神経伝達物質であることからE2020はAChE阻害を作用機序とするアルツハイマー治療薬として現在臨床試験の段階に至っている。この新規薬物であるE2020は不斉炭素を有しているが開発はラセミ体として進められている。そこでアビジ

ンカラムによるE2020の光学分割について検討した。なおアビジンDSCカラム(第3章参照)についても合わせて検討した。

[HPLC条件]

カラム：アビジンカラム、長さ250mm・内径4.6mm

移動相：酢酸アンモニウム緩衝液／アセトニトリル混液

(質量分析装置との連結を考慮して、揮発性緩衝液である酢酸アンモニウムを使用した)

流速：1.0ml/min

カラム温度：約20～25℃

検出波長：271nm

試料：E2020を生理食塩水に溶かし100μg/mlとした

試料注入量：10μl

[結果]

移動相中のアセトニトリル濃度とE2020の保持・分離について表19に示した。アビジンカラムおよびアビジンDSCカラムともに分離モードは逆相であった。またアセトニトリル濃度が増加するにつれて分離係数が低下した。これはアビジン分子上におけるE2020の光学認識部位に疎水的相互作用が大きく関与していると考えられる。アビジンカラムはアビジンDSCカラムに比べて保持が強く、かつ分離も良いことから(第3章図34)アビジン固定化用のスペーサーがE2020の保持や分離に寄与しているものと思われる。

次に移動相のpHの影響について表20に示した。移動相のpHが高くなるにつれてアビジンカラムおよびアビジンDSCカラム上でのE2020の保持が強くなった。E2020のpKaが約9付近にあることから、今回検討した移動相のpH範囲においてE2020の電荷は一定であると考えられるので、保持の変化はアビジン側の変化によるものと思われる。一方、アビジンカラムでは移動相のpH5付近で分離係数(α)

表19 E2020に対するアビジンカラムおよびアビジンDSCカラムにおける移動相中のアセトニトリル濃度の影響

k_1 はR-E2020の、 k_2 はS-E2020のキャパシティーファクター
αは分離係数(k_1/k_2)、Rsは分離度を表わす

HPLC条件、移動相0.1M酢酸緩衝液(pH5.0)／アセトニトリル混液
その他の条件については本文参照

content(%)	1.0%	2.5%	3.6%	5.0%	6.2%	7.5%	10.0%	12.5%
Avidin column								
k_1	-	10.85	-	5.60	-	3.57	2.57	1.93
k_2	-	21.12	-	9.80	-	5.65	3.82	2.72
α	-	1.95	-	1.75	-	1.58	1.49	1.41
Rs	-	4.20	-	4.20	-	3.42	2.43	1.60
Avidin DSC column								
k_1	0.92	0.82	0.47	0.45	0.36	0.30	-	-
k_2	1.25	1.13	0.68	0.45	0.36	0.30	-	-
α	1.36	1.39	1.40	1	1	1	-	-
Rs	0.94	1.14	1.50	0	0	0	-	-

表20 E2020に対するアビジンカラムおよびアビジンDSCカラムにおける移動相のpHの影響
移動相：0.1M酢酸アンモニウム緩衝液／アセトニトリル=95/5
その他の条件については本文参照

PH	6.9	6.6	6.4	6.1	5.9	5.7	5.4	5.0	4.6
Avidin column									
k_1	15.31	-	11.17	-	9.08	-	7.08	5.59	4.18
k_2	24.40	-	18.47	-	15.53	-	12.40	9.77	6.96
α	1.59	-	1.65	-	1.71	-	1.75	1.75	1.67
Rs	2.19	-	2.72	-	3.16	-	3.88	4.20	3.82
Avidin DSC column									
k_1	-	0.67	-	0.58	-	0.52	0.49	0.46	0.38
k_2	-	0.79	-	0.70	-	0.60	0.49	0.46	0.38
α	-	1.18	-	1.20	-	1.17	1	1	1

が最大となったが、アビジンDSCカラムではpH 6付近で α が最大となった。このことはスパーサーが何らかの形で分離に影響を与えているものと考えられる。このように移動相のpHに対する分離挙動と保持挙動とが一致しなかったことから、両カラムの保持に関しては光学認識能を有する部位と持たない部位が存在する可能性がある。

次に、移動相中の酢酸アンモニウム濃度について検討した結果を表2 1に示した。

表2 1 E 2 0 2 0に対するアビジンカラムおよびアビジンDSCカラムにおける移動相中の酢酸アンモニウム濃度の影響
移動相：酢酸アンモニウム緩衝液（pH 5. 0）／アセトニトリル＝9 5／5
その他の条件については本文参照

Concentration	10 mM	50 mM	100 mM	200 mM	300 mM
Avidin column					
k_1	1.72	4.03	5.60	6.65	7.32
k_2	3.08	7.16	9.80	11.11	11.86
α	1.79	1.78	1.75	1.67	1.62
R_s	2.73	4.17	4.20	3.97	3.60
Avidin DSC column					
k_1	0	0.16	0.49	0.76	0.97
k_2	0	0.16	0.49	0.76	0.97
α	1	1	1	1	1

アビジンカラムおよびアビジンDSCカラムともに、緩衝塩濃度が高くなるにつれてE 2 0 2 0の保持が強くなった。これは酢酸アンモニウムによるイオンペア効果や塩析効果¹³⁶⁾などのクーロン力の影響であると考えられた。アビジンカラム上での光学分割に関しては、塩濃度100 mMにおいて分離度が最大となった。移動相のpHの影響と同様に、塩濃度に対しても分離挙動と保持挙動とが一致しなかった。

以上の結果からアビジンカラムによりE 2 0 2 0の光学分割が可能となり、移動相条件として0. 1 M酢酸アンモニウム緩衝液（pH 5）／アセトニトリル＝9 5／5（v／v）が最適であった。

2-2 アビジンカラムによるE 2 0 2 0の血清直接注入分析

E 2 0 2 0は不斉炭素の α 位にカルボニル基が存在するので、水溶液中で容易にラセミ化を起こす。従って血清中のE 2 0 2 0を分離定量する際に抽出操作などの前処理を施すことは、操作中にE 2 0 2 0が光学転移を起こす可能性がある。そこでアビジンカラムを用いて血清直接注入による分析を試みた。

まずアビジンカラムに血清試料の直接注入を可能にするためには、血清タンパクがアビジンカラムに吸着されることなく溶出される必要がある。第3章の結果から、移動相のpHを2付近あるいは7付近にすることで血清試料直接注入が可能であるが、移動相のpHが5付近の時に最も良い光学分割が得られた。即ち、血清試料直接注入に適した移動相条件と光学分割に適した条件とが異なった。また、これまで述べてきたアビジンカラムによる血清試料直接注入分析では一度の試料注入量は最大20 μ lであり、これ以上の注入では血清成分や薬物のピーク幅が広がり分離分析において不利となる。しかしE 2 0 2 0の体内挙動を調べるためには、低濃度（少なくとも数ng/ml）での測定が必要である。従って血清試料を直接注入し高感度分析を行なうこと^{147, 148)}を目的として図4 5に示したカラムスイッチングシステムを考案した。このシステムでは移動相を変換および試料を濃縮する機能を備えている。

図4 5において、TCには濃縮用アビジンカラム（長さ10 mm・内径4 mm）、COLUMNには光学分割用アビジンカラム（長さ250 mm・内径4. 6 mm）を使用し、検出（DET）はUV検出器（271 nm）を用いた。血清試料を試料注入口（INJ）から注入して、移動相1（MP1）により試料は濃縮用カラムに送られる。ここで血清タンパクは濃縮用カラムに保持されることなく通過するのに対してE 2 0 2

0は濃縮用カラムに保持濃縮される必要がある。従ってこの条件を満たすために移動相1は0.1M酢酸アンモニウム緩衝液(pH7)とした。次に濃縮用カラムで濃縮されたE2020は、6方バルブ(V)を切り換えることにより移動相2(MP2)により

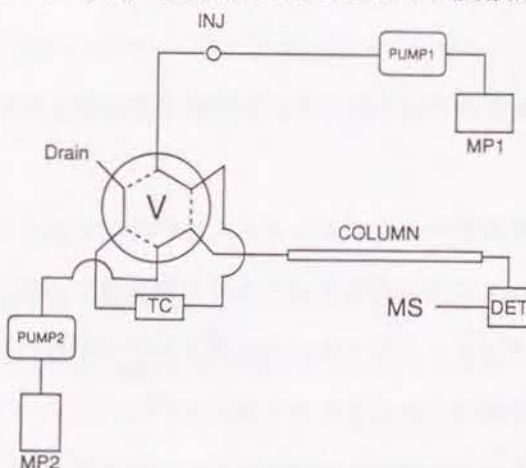


図4-5 アビジンカラムと質量分析装置を直結するためのカラムスイッチングシステム
MP1: 移動相1 (0.1M酢酸アンモニウム緩衝液・pH7)
MP2: 移動相2 (0.1M酢酸アンモニウム緩衝液・pH5/アセトニトリル=95/5)
INJ: 試料注入口、DET: 検出器 (UV271nm)、MS: 質量分析装置
TC: アビジン濃縮カラム (長さ10mm・内径4mm)
COLUMN: アビジンカラム (長さ250mm・内径4.6mm)
V: スイッチングバルブ、PUMP1およびPUMP2: HPLC用ポンプ
その他の条件および操作手順については本文参照

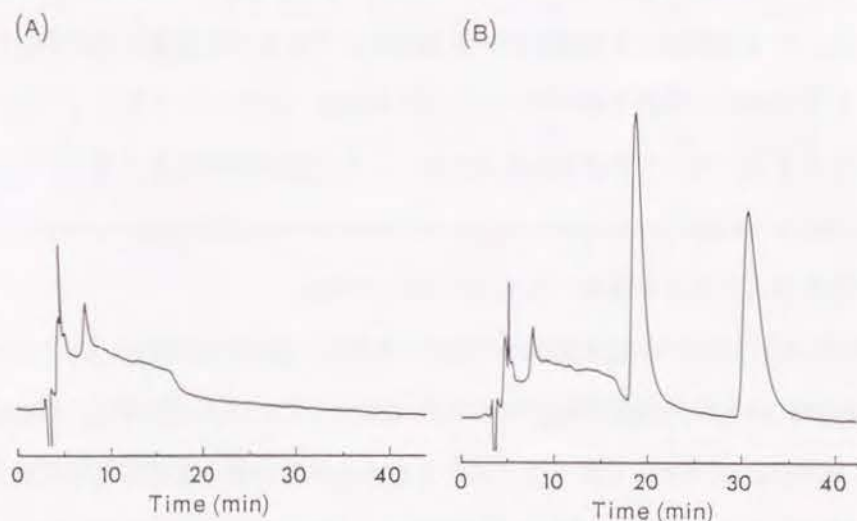


図4-6 (A) ヒト血清ブランク、(B) 血清試料 (E2020: 1 µg/ml) それぞれ0.5mlを直接注入したとき得られたクロマトグラム
HPLC条件は図4-5と同じ

光学分割用アビジンカラムに送られて光学分割される。移動相2はE2020の分離に最も良い0.1M酢酸アンモニウム緩衝液(pH5)/アセトニトリル=95/5とした。ヒト血清ブランク試料を500 µl直接注入したときのクロマトグラムを図4-6(A)に、E2020を添加したヒト血清試料(1 µg/ml)を500 µl直接注入したときのクロマトグラムを図4-6(B)に示した。E2020は血清成分の妨害を受けず光学分割された。E2020を血清に添加したヒト血清試料と生理食塩水に添加した標準試料をそれぞれ本システムで分析して(注入量0.25ml・100 ng/ml)、ヒト血清試料からのE2020の回収率を求めたところ98.5%であった(表2-2)。このことは血清中のE2020の総濃度が測定されたことを示している。また、ヒト血清試料を繰り返し注入したときの保持時間の再現性の結果も表2-2に示した。

表2-2 アビジンカラムを用いたカラムスイッチング法によるE2020の保持時間と回収率
E2020を100 ng/ml含むヒト血清試料0.25mlを7回繰り返し注入して測定
HPLC条件は図4-5と同じ

	t_1	t_2	recovery
mean	16.90	28.55	98.5 %
C.V. (%)	0.49	0.74	1.33

t_1 and t_2 mean the retention time of R- and S- E2020 enantiomers, respectively.

C.V. means the coefficient value ($n = 7$).

前処理せずに血清試料を直接注入しているので再現性の良い結果が得られた。次に、濃縮カラムでのE2020の濃縮効果について検討した。1 µg/mlのE2020を含むヒト血清試料を用いて、注入量を変えて本システムで分析を行なった時の注入量とピーク面積の関係を図4-7に示した。血清試料注入量25 µlから0.7 mlにおいて相関係数0.997の直線性が得られた。この結果から、本システムでは血清試料を少なくとも0.7 mlまでは濃縮可能であり、血清中の低濃度のE2020の分析に有用であると考えられる。また濃縮カラムに合計10 ml以上の血清試料を注入しても、クロ

マトグラムに変化は認められなかった。従って本システムは耐久性に優れ、実用上問題ないものと思われる。

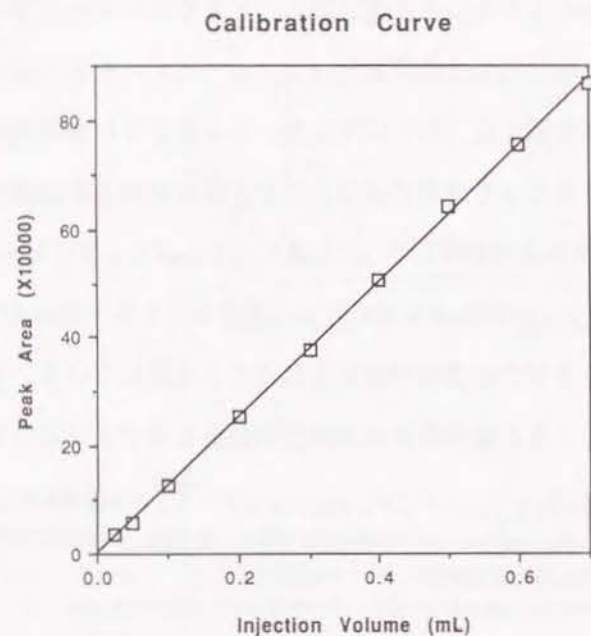


図4-7 血清試料の注入量 (ml) とE2020のピーク面積との関係
E2020をヒト血清に添加して $1\mu\text{g}/\text{ml}$ とした

2-3 アビジンカラムと質量分析装置との連結 (LC/MS)

予想されるE2020の6種類の代謝物の構造を図4-8に示した。E2020の体内動態研究のためには、血清成分はもちろんこれら推定代謝物と未変化体を分離しかつ光学分割も行なう必要がある。そこでヒト血清にE2020及びその推定代謝物を添加して、先に示したシステム (図4-5) により得られたクロマトグラムを図4-9に示した。M1以外はアビジンカラムにより同時に光学分割が可能であったが、分離されたエナンチオマーのピークが他物質のエナンチオマーと相互に重なった。従ってE2020とその推定代謝物全てを完全に分離できる条件を見いだすことはできなかった。

現在HPLCは原則として溶媒に溶ける全ての化合物が分析対象であり、分離手段として最も汎用されている。一方、化合物の構造に関する情報を提供して、また紫外吸

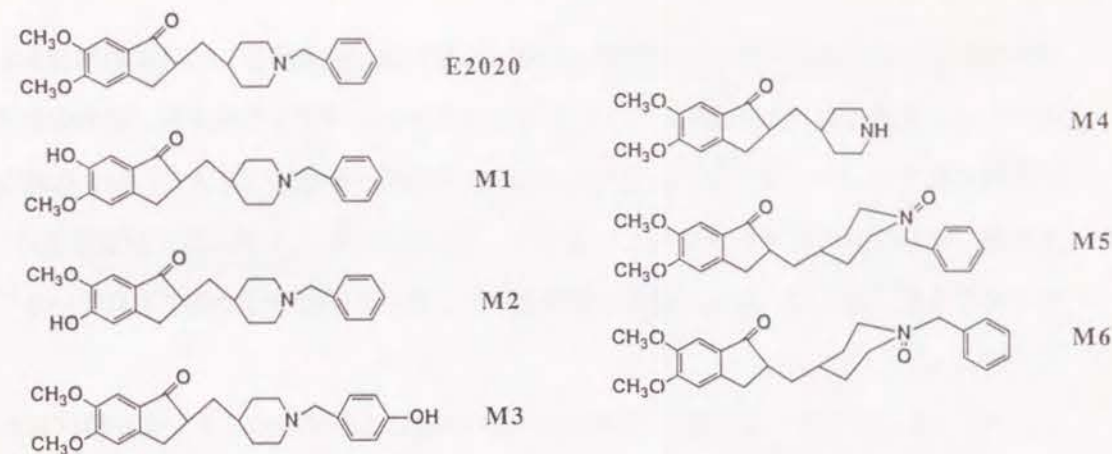


図4-8 E2020とその推定代謝物の構造式

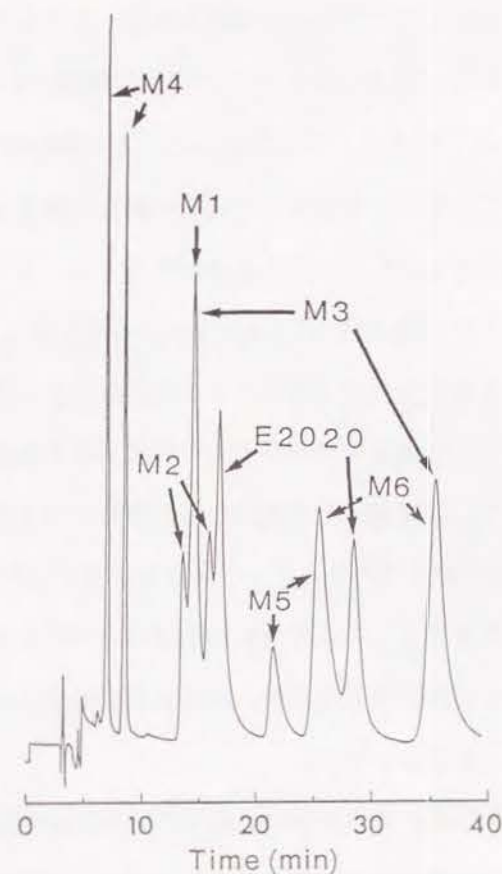


図4-9 ヒト血清にE2020およびその推定代謝物を添加して得られたクロマトグラム
HPLC条件は図4-5と同じ

収のない化合物も検出可能である質量分析法 (MS) は、検出法として種々の特長を有している。MS におけるイオン化には種々の方法があるが中でも不揮発性、熱不安定性の物質に対するソフトなイオン化法の一つである高速原子衝撃法 (FAB) は、広範な化合物に適用できるので汎用されている¹⁴⁹⁾。従って HPLC と FAB-MS を組み合わせた LC/MS は、医学・薬学・環境化学など多くの研究分野で使用されている¹⁵⁰⁻¹⁵⁵⁾。

一方、LC/MS では一般に不揮発性の塩の存在により試料のイオン化が妨げられるので^{156, 157)} 血清成分を直接イオン源へ導入することは望ましくない。そこで先に示したカラムスイッチングシステム (図 4 5) を用いて、光学分割用アビジンカラムから溶出した画分を MS に直接導入した。このシステムでは血清中の不揮発性の塩は濃縮カラムで除去されて MS に影響を及ぼさないと考えられる。ところで FAB-MS におけるイオン化にはマトリックスが必要である¹⁴⁹⁾ ので、移動相 2 にマトリックスとして汎用されているグリセリン¹⁵⁸⁾ を 0.8% 添加した。また移動相 2 の pH 5 では、E2020 は正電荷を帯びていることを考えて FAB-MS では正イオンによる検出を行なった。図 4 9 と同一試料をこの LC/MS によってスキャンモード分析した結果を図 5 0 に示した。E2020 が $[M+H]^+$ ($m/z = 380$) として検出されて、他の推定代謝物からの分離が可能となった。またイオン化に際して、そのフラグメントイオンが未変化体 (E2020) と同じ質量を与える可能性がある推定代謝物として M5 と M6 が考えられる。そこで LC/MS 分析を行なった際の、M5 のマススペクトルを図 5 1 に示した。 $[M+H]^+$ が主であり $m/z = 380$ のフラグメントイオンはほとんど観測されなかった。従って E2020 未変化体を選択的に分析できると考えらる。また本システムでは濃縮カラムで脱塩されるので、血清試料直接注入による LC/MS 分析でイオン化が妨げられることはなかった。

血清中薬物の定量を行なう際、その精度向上のために内部標準法が用いられることが一般的である。通常、内部標準物質は目的の化合物と類似した物理化学的性質を有していることが望ましく、かつ未変化体や代謝物、生体成分との分離も充分でなければな

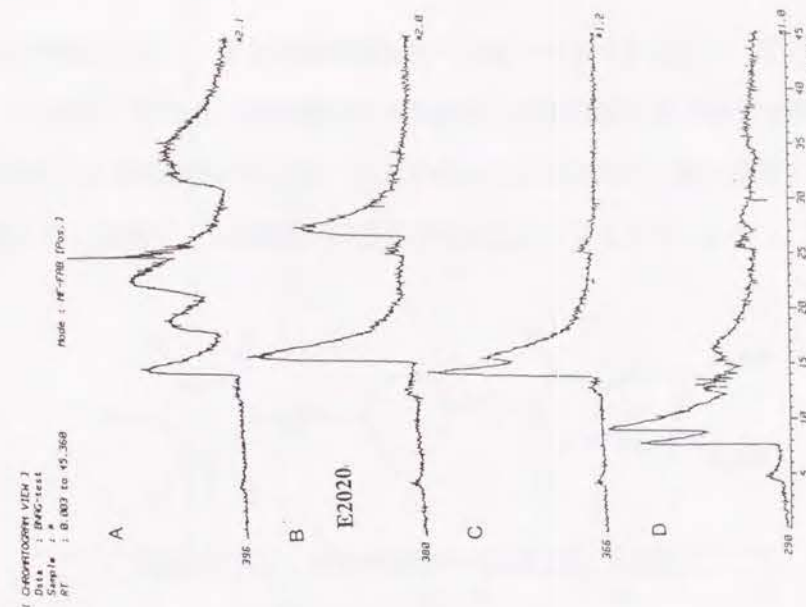


図 5 0 LC/MS によって得られたマスククロマトグラム
ヒト血清試料に E2020 およびその推定代謝物を添加して図 4 5 のシステムにより分析
移動相にはグリセロールを 0.5% 添加、その他の条件については本文参照

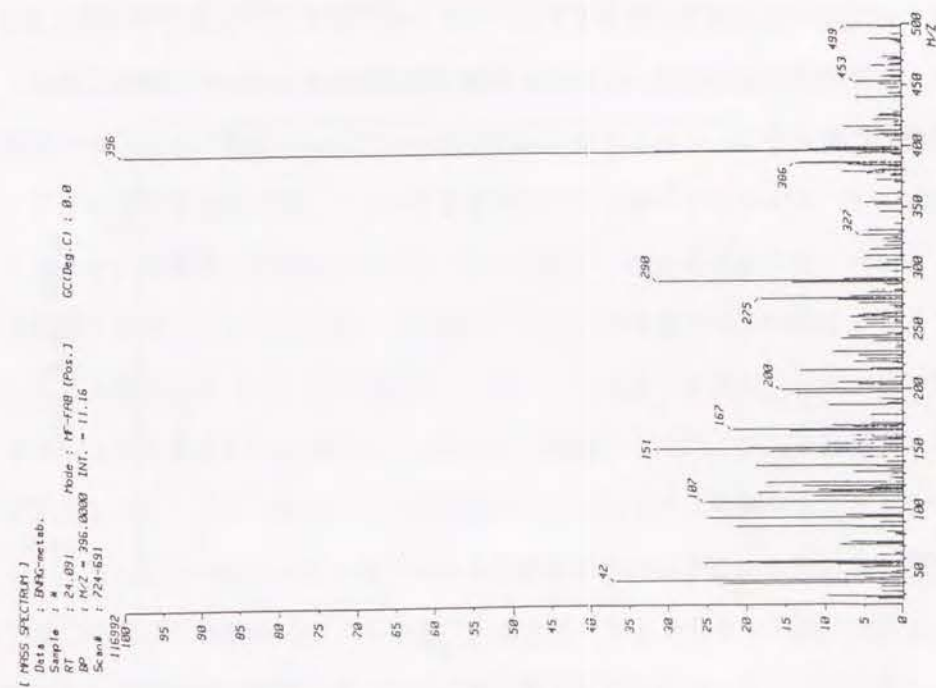


図 5 1 LC/MS により得られた推定代謝物 M5 のマススペクトル

らない。従って、このような条件を満たす内部標準物質を得るために時間を要することが多い。目的化合物の安定同位体は、物理化学的性質が目的化合物とほぼ同じであり、またMSでは質量分離が可能であることからLC/MSの内部標準として使用できる利点がある¹⁵²⁾。そこでE 2 0 2 0の重水素標識体を内部標準として使用した(図5 2)。

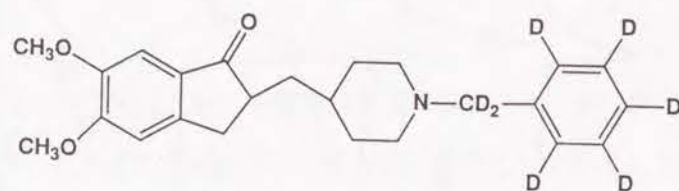


図5 2 E 2 0 2 0の内部標準物質 (IS) の構造式

LC/MSでの問題点として、FAB-MSへの試料導入量が制限されることがあげられる。これはLCからの溶出液を大量にMSへ導入すると、移動相が気化してMSのイオン化室の真空状態を維持できなくなるからである¹⁵⁹⁾。著者が使用したFAB-MS装置の排気能力では、LCからの導入量は $5 \mu\text{l}/\text{min}$ が限度である。つまり移動相2の流速が $1.0 \text{ ml}/\text{min}$ で行なった図5 0の実験ではLCからの溶出物のうち僅か0.5%がMSに導入されたにすぎない。そこで小口径アビジンカラム(内径 1.5 mm ・長さ 250 mm)を作製して、このカラムを用いて流速 $100 \mu\text{l}/\text{min}$ でE 2 0 2 0の光学分割を行なったときのクロマトグラムと、これまで使用してきたアビジンカラム(内径 4.6 mm 、流速 $1.0 \text{ ml}/\text{min}$)により得られたクロマトグラムを図5 3に示した。この結果、小口径アビジンカラムでもE 2 0 2 0の学分割が可能であることを確認した。このように流速を10%に減少することによってMSに導入される移動相の割合を10倍に増やすことが可能となった。

以上の検討結果を踏まえて、重水素化E 2 0 2 0を内部標準として小口径アビジンカラムを用いてLC/MSによる定量を行なった。なおMSでの測定はより高感度測定を行なうために選択的イオンモニタリング(SIM)モードにより、 m/z 380およ

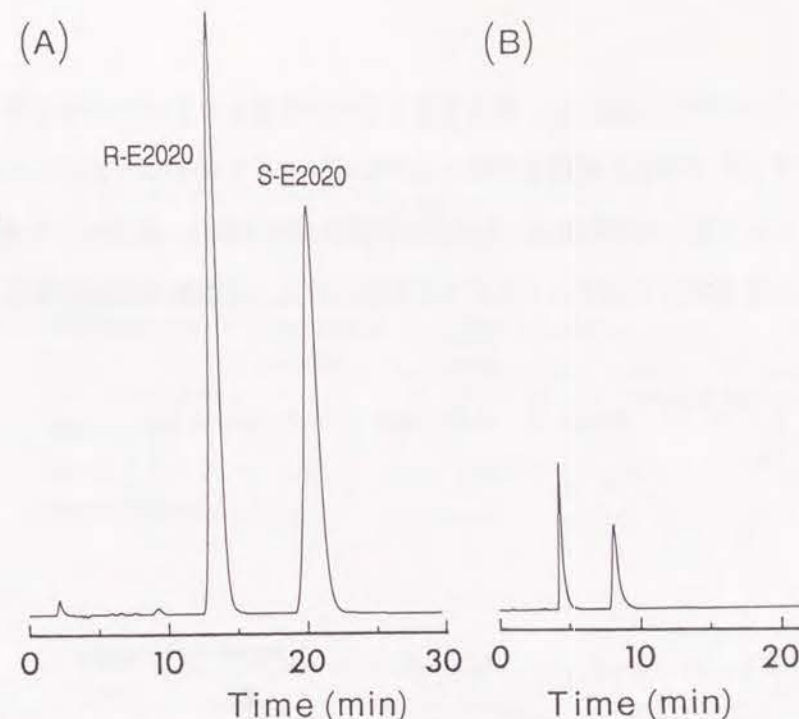


図5 3 (A) ミクロボアアビジンカラム・内径 1.5 mm と(B) アビジンカラム・内径 4.6 mm を用いて得られたHPLCクロマトグラムの比較(カラムの長さは共に 250 mm)
移動相の流速: (A) $0.1 \text{ ml}/\text{min}$ 、(B) $1.0 \text{ ml}/\text{min}$
移動相: 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液($\text{pH} 5$) / アセトニトリル = $90/10$
検出波長: 270 nm 、注入量: E 2 0 2 0をラセミ体として 500 ng

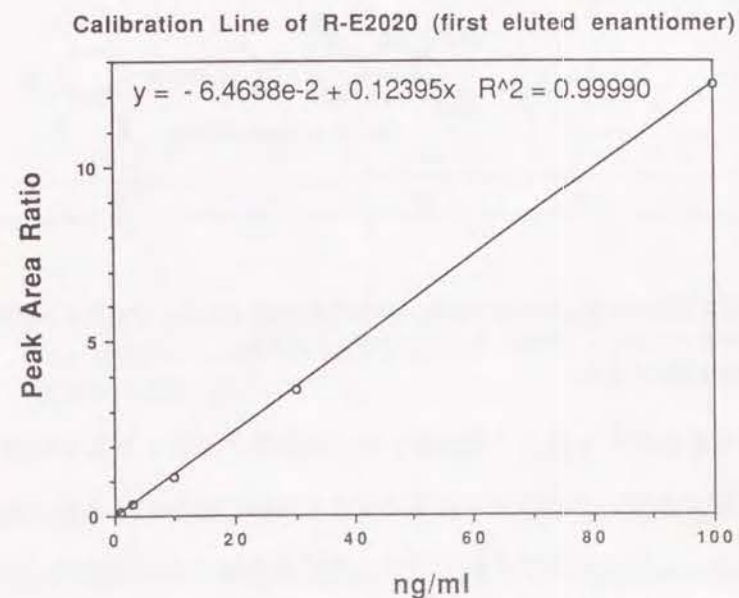


図5 4 ミクロボアアビジンカラムを用いたLC/MS(SIMモード)により得られた検量線
横軸: R-E 2 0 2 0の濃度、縦軸: ISに対するR-E 2 0 2 0のピーク面積比
移動相にはグリセロール0.8%添加、その他の分析条件は図4 5および本文参照

び387のイオンのみを測定した。血中E2020の濃度とSIMクロマトグラムのピーク面積比とをプロットした結果を図54に示した。ラセミ体として1.0 ng/ml ~ 100 ng/ml まで相関係数0.999の直線性が得られた。E2020濃度が3.0 ng/ml のときのSIMクロマトグラムを図55に、この濃度での再現性を表23に示した。

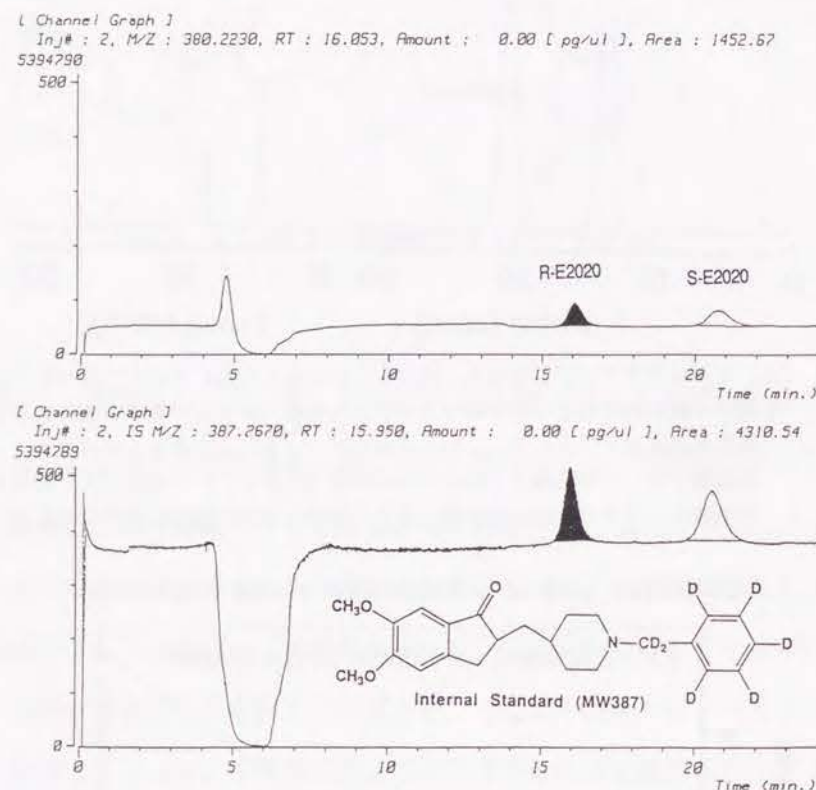


図55 ミクロボアビジンカラムを用いたLC/MSにより得られたSIMクロマトグラム
上段がE2020、下段がISのマスクロマトグラム
分析条件は表23と同じ

これらの結果から本システムにより高感度かつ再現性よくE2020の光学異性体分析を行なうことができた。またラットにE2020を経口投与し採血後、血清試料を本システムに直接注入したときのSIMクロマトグラムを図56に示した。このようにラット血清試料を前処理せずにE2020のピークを検出することができ、かつ光学分割を行なうことができた。

表23 ミクロボアビジンカラムを用いたLC/MSの再現性 (5回繰り返し測定)
E2020をラセミ体として6 ng/ml、ISをラセミ体として10 ng/ml 注入
1回に0.5 ml 注入、その他の条件は図54と同じ

E2020 enantiomer	Concentration (ng/ml)	Peak Area Ratio		C.V. (%)	n
		Mean	S.D.		
R-E2020 (first elution)	3	0.3416	0.003647	1.07	5
S-E2020 (second elution)	3	0.3372	0.007463	2.21	5

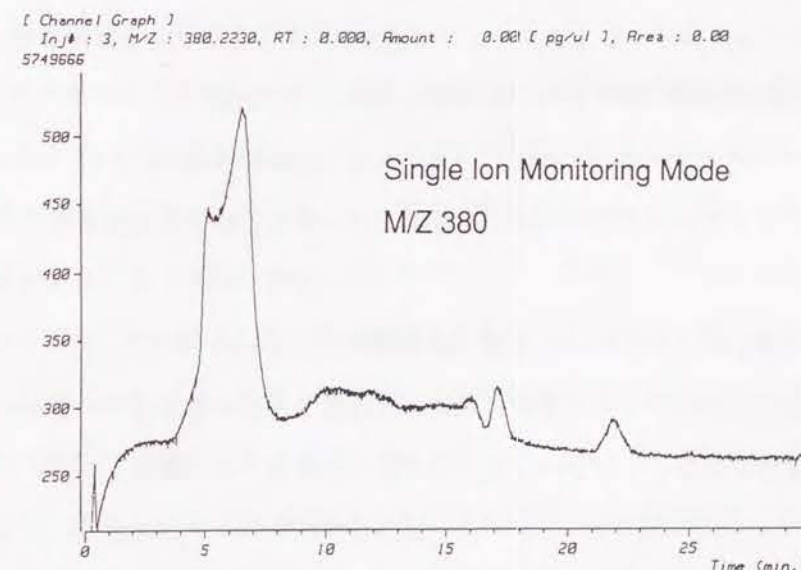


図56 ラットにE2020を経口投与して30分後の血清試料をアビジンカラムに直接注入して
LC/MSにより得られたSIMクロマトグラム
分析条件は表23と同じ

以上の検討からアビジンカラムを用いたこのLC/MSは、血中E2020を前処理なしに光学分割できて、しかも血清成分はもちろん代謝物や内部標準物質までも考慮して高感度に再現性よく定量することができた。迅速な分析が可能な本システムは、今後の血中光学異性体薬物の体内動態研究に大きく寄与できる。

実験材料の部

1、実験装置

1) HPLCシステム

ポンプ：島津LC-9A（島津製作所、京都）、4台

検出器：島津SPD-6A（島津製作所）、2台

システムコントローラー：島津SCL-6B（島津製作所）、1台

オートインジェクター：島津SIL-6B（島津製作所）、1台

マニュアルインジェクター：レオダイン・7125（レオダイン社、アメリカ）

試料冷却器：WIG-7000A（イシド、千葉）

インテグレーター：島津C-R4AX（島津製作所）、1台

スイッチング六方バルブ：レオダイン・7000または7060

2) 冷却遠心機：CPR-005（島津製作所）

3) 試験管濃縮ユニット：窒素ガス吹き付け式TAH-2G（タイテック社、埼玉）

4) 質量分析装置：JMS-SX102A（日本電子社、東京）

JMA-DA6000データシステム

空圧スプリット式フリットFABインターフェイス

5) カラム充填用ポンプ：PUS-8（ジーエルサイエンス社）

6) U-3500形自記分光光度計（日立製作所、東京）

7) 振とう機：KM-SHAKER（イワキ、東京）

8) PHメータ：TDA HM-60S（東亜電波化学、東京）

9) 超音波洗浄器：UTB-152・150W（シャープ）

10) 電子天秤：Mettler HK60（シイベル、東京）

2、試薬

水、アセトニトリル、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール及びテトラヒドロフランはHPLCグレードを、リン酸、過塩素酸及び水酸化ナトリウム水溶液は特級グレードを和光純薬社（大阪）から購入した。リン酸1カリウム、リン酸2カリウム、酢酸アンモニウム、酢酸、グリセロールは試薬特級を関東化学社（東京）が製造したものを使用した。ジサクシニミジルサベレートとトリフルオロ酢酸はピアス社（アメリカ）からジサクシニミジルカルボネートと1-ペンタンスルホン酸ナトリウムはアルドリッチ社（アメリカ）から、クマシーブリリアントブルーはシグマ社（アメリカ）から購入した。シリカゲルを担体とするHPLC用充填剤はナーゲル社製（ドイツ）・粒子径 $5\mu\text{m}$ のものを使用した。

アビジンとオボムコイドはエーザイ（株）川島工場で鶏の乾燥卵白から精製した。塩酸ペラバミルとその代謝物はクノール社（ドイツ）から入手し、E2020とその代謝物はエーザイ筑波研究所で合成した。p-アミノ安息香酸n-プロピルと安息香酸n-ブチルは東京化成工業（東京）から、ケトプロフェン、フルルビプロフェン及びイブプロフェンはシグマ社から購入した。安息香酸エチルと（+）-ビオチンは和光純薬製のものを、p-ヒドロキシ安息香酸n-プロピルは関東化学製のものを、フレカイニドとその代謝物は3M社（アメリカ）から入手した。

ヒト血清は、健常人男性の上腕静脈からヘパリン採血し、毎分3000回転で遠心後上清をとり、 $0.20\mu\text{m}$ のフィルター（DISMIC-25、アドバンテック、東京）を通した後使用した。

HPLC用移動相は目的の溶媒を混合した後、減圧下超音波洗浄器により充分脱気を行ない使用した。

3、HPLC用充填カラム

イナートシルODS-2（長さ150mm・内径4.6mm）はジーエルサイエンス社から、オボムコイド固定化したカラムであるウルترونES-OVM（長さ150

mm・内径4.6、2.1、1.0及び0.5mm)とウルترونES—OVMG(長さ10mm・内径4.0mm及び長さ3.5mm・内径2.1mm)は信和化工(京都)から購入した。なおHPLC用空カラムはエンドフィルターの付いたジーエルサイエンス製を使用した。

結 論

以上、著者はタンパク固定化カラムを用いる血中光学異性体薬物の分析に関する研究を行ない、次の結論を得た。

(1) カラムスイッチングシステムの開発

従来のカラムスイッチングシステムでは、カラム間で性質の大きく異なる移動相を使用することが困難であった。そこで著者は、移動相変換システムとして希釈管と濃縮カラムを用いることによって、オクタデシルシリル化シリカゲル充填(ODS)カラムとオボムコイド(OVM)カラムのオンライン化システムを開発した。このシステムにより、移動相中の有機溶媒含量が多いODSカラムから比較的疎水性の弱いOVMカラムへのカラムスイッチングが可能となった。さらに小口径OVMカラムをこのシステムに用いることによって高感度化を行なうことができた。

(2) カラムスイッチングシステムによる血中光学異性体薬物の分析

モデル化合物として酸性薬物ケトプロフェンと塩基性薬物ベラパミルを用いることによって、著者の開発したカラムスイッチングシステムの有用性を示した。このシステムではODSカラムによって血中成分や代謝物から目的成分を分離して、内部標準法により定量を行ない、その後目的成分のみOVMカラムに送り込み光学分割を行なうことができた。濃縮カラムと希釈管の使用によって、光学不活性カラムと光学活性カラムとの間で組成が大きく異なる移動相が使用可能となり、種々の血中光学異性体薬物の分析に寄与できることが確認された。

(3) 血清試料直接注入可能なアビジンカラムの開発

一般に高速液体クロマトグラフィー法により血中薬物を分析する際に、あらかじめ除タンパクなど前処理操作を行なう必要がある。そこで著者は効率的な血中薬物分析法

の確立を目指して血清試料直接注入可能なカラムの開発を行なった。糖タンパクであるアビジンをメチレン鎖6個からなるスペーサーを介してアミノプロピルシリカゲルに固定化したアビジンカラムを合成した。このカラムに血清試料を注入してタンパクの回収率を求めた結果、移動相のpHが2あるいは7のとき回収率がほぼ100%であり血清直接注入が可能であった。またケトプロフェンを含む血清試料をアビジンカラムに直接注入したところ、ケトプロフェンは血清成分から分離され、同時に光学分割も行なうことができた。このときのケトプロフェンの血清試料からの回収率はR、Sそれぞれ約100%であり血清中の全薬物濃度の測定が可能であった。

(4) アビジンカラムとオボムコイドカラムの保持挙動の比較

移動相のpHの影響について比較検討した結果、化合物によって移動相のpH変化に対して光学認識および保持挙動との関係が異なることから、アビジンカラムもオボムコイドカラムも複数の光学認識部位を有するものと考えられた。また両カラムとも移動相中のメタノール濃度が高くなるにつれて化合物の保持時間が短くなったことから、逆相保持機構を有することが示唆された。さらに移動相中の塩濃度や塩の種類によっても光学認識能や保持が影響を受けたことから、両カラムとも薬物の保持・光学認識機構は疎水力や静電力など種々の作用が関与していることが示唆された。また両カラムを種々の有機溶媒や緩衝液を使用した後の各化合物の溶出挙動は、初期状態と比べてほとんど変動がなかったことから実用的な耐久性を有していた。

(5) アビジンカラムを用いたカラムスイッチングシステムの検討

モデル化合物としてフレカイニド(FLC)とその主代謝物の一つであるME-Iを含む血清試料をアビジンカラムに直接注入したところ、ME-Iは光学分割できたが、FLCは光学分割可能な条件を見いだせずに血清成分からの分離のみに留まった。そこでアビジンカラムとオボムコイドカラムを用いたカラムスイッチングシステムを開発した結果、FLCがオボムコイドカラムにより光学分割できた。この結果から両カラムを

オンラインで結合することによって、広範な化合物に対して血清試料直接注入による光学異性体の分離が可能となった。

また濃縮用アビジンカラムと小口径アビジンカラムを用いたカラムスイッチングシステムに質量分析装置を直結することによって、血清中の低濃度E2020の光学異性体を、前処理することなく代謝物や血清成分から分離定量することが可能となった。

以上著者は、タンパク固定化カラムを用いる血中の光学異性体薬物のHPLC分析システムを開発した。濃縮カラムと希釈管を用いた移動相変換システムによる従来のカラムスイッチングシステム法の改良や、高感度化を目的とした小口径カラムの利用、血清試料直接注入分析のためのアビジンカラムの開発、質量分析装置の直結による選択性の向上は、不斉中心を有する種々の薬物の分析に役立つものと考えられる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究にあたり終始ご懇篤なるご助言とご鞭撻を賜りました京都大学 中川照眞教授、ならびに御激励戴いた京都大学 田中久名誉教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の機会と本論文発表の許可を与えて戴いたエーザイ株式会社研究開発本部長 大野雅二博士ならびに篠田愛信副本部長に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、御懇切なるご指導ご助力を賜りましたエーザイ株式会社研究四部部長 里 忠博士、構造物性室 吉田 豊室長、主任研究員 浅川直樹博士に慎んで感謝の意を表します。

さらに種々の有益なご助言ご協力を頂きました京都大学 澁川明正博士、エーザイ株式会社川島工場 井上 廣課長、三輪敏紳博士、ならびに研究四部 梶間 隆主任研究員、大江浩志研究員、松井賢司研究員、真野成康研究員に深謝いたします。

最後に、本論文の作成に当たり内面からの協力を惜しかなかった最愛の妻 千夏子に、そして健康な身体に育ててくれた父 小田吉博、母 和子に感謝する。

参考文献

- 1) T. A. G. Noctor, B. L. Clark and A. F. Fell, *Analyt. Proc.*, 23, 441-443(1986).
- 2) R. H. Levy and A. V. Boddy, *Pharm. Res.*, 8, 551-556(1991).
- 3) A. M. Evans, R. L. Nation, L. N. Snasom, F. Bocher and A. A. Somogyi, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 26, 771-780(1988).
- 4) F. Jamali, R. Mehvar and F. M. Pasutto, *J. Pharm. Sci.*, 78, 695-715(1989).
- 5) D. E. Drayer, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 40, 125-132(1986).
- 6) E. J. Ariens, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 26, 663-668(1984).
- 7) K. M. Williams, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 16, 465-470(1989).
- 9) T. Walle and U. K. Walle, *Trends Pharmac. Sci.*, 7, 155-158(1986).
- 10) B. Testa, *Trends Pharmacol. Sci.*, 7, 60-64(1986).
- 11) K. Williams and E. Lee, *Drugs*, 30, 333-354(1985).
- 12) T. J. Wozniak, R. J. Bopp and E. C. Jensen, *J. Pharm. Biol. Anal.*, 9, 363-382(1991).
- 13) A. M. Dyas, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10, 383-404(1992).
- 14) D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 59, 84A-91A(1987).
- 15) R. L. Nation, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 16, 471-477(1989).
- 16) C. H. Lochmuller and R. W. Souter, *J. Chromatogr.*, 113, 283-302(1975).
- 17) J. Martens and R. Bhushan, *J. Liq. Chromatogr.*, 15, 1-27(1992).
- 18) H. T. Karnes and M. A. Sarkar, *Pharm. Res.*, 4, 285-292(1987).
- 19) C. Petersson and G. Schill, *J. Chromatogr.*, 204, 179-189(1981).
- 20) C. Petersson, *J. Chromatogr.*, 316, 553-567(1984).
- 21) J. Debowski, D. Sybilska and J. Jurczak, *J. Chromatogr.*, 237, 303-306(1982).
- 22) M. Gazdag, G. Szepesi and L. Huszar, *J. Chromatogr.*, 351, 128-135(1986).
- 23) D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, 7(S-2), 353-376(1984).
- 24) C. E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.*, 47, 3940-3942(1952).

- 2 5) W. H. Pirkle, M. Hyun, A. Tsipouras, B. C. Hamper and B. Banks, J. Pharm. Biomed. Anal., 2, 173-181 (1984).
- 2 6) D. R. Taylor and K. Maher, J. Chromatogr. Sci., 30, 67-85(1992).
- 2 7) V. A. Davankov and S. V. Rogozhin, J. Chromatogr., 60, 280-283(1971).
- 2 8) W. H. Pirkle, D. W. House and J. M. Finn, J. Chromatogr., 192, 143-158(1980).
- 2 9) G. Gubitz, W. Jellenz and J. Schonleber, J. High Res. Chromatogr. Commun., 3, 31-32(1980).
- 3 0) K. R. Lindner and A. Mannschreck, J. Chromatogr., 193, 308-310(1980).
- 3 1) Y. Okamoto and K. Hatada, J. Liq. Chromatogr., 9, 369-378(1986).
- 3 2) S. Allenmark, B. Bomgren and H. Boren, J. Chromatogr., 237, 473-477(1982).
- 3 3) J. Hermansson, J. Chromatogr., 269, 71-80(1983).
- 3 4) T. Miwa, M. Ichikawa, M. Tsuno, T. Hattori, T. Miyakawa and Y. Miyake, Chem. Pharm. Bull., 35, 682-686(1987).
- 3 5) P. M. Udvarhelyi, D. C. Sunter and J. C. Watkins, J. Chromatogr., 519, 69-74(1990).
- 3 6) D. W. Armstrong and W. DeMond, J. Chromatogr. Sci., 22, 411-421(1984).
- 3 7) I. W. Wainer and M. C. Alembik, Chromatogr. Sci., 40, 355-384(1988).
- 3 8) A. Pedro and F. Lehmann, Trends. Pharmac. Sci., 7, 281-285(1986).
- 3 9) S. R. Narayanan, J. Pharm. Biomed. Anal., 10, 251-262(1992).
- 4 0) T. Miwa, T. Miyakawa, M. Kayano and Y. Miyake, J. Chromatogr., 408, 316-322 (1987).
- 4 1) M. Okamoto and H. Nakazawa, J. Chromatogr., 504, 445-449(1990).
- 4 2) T. Miwa, H. Kuroda and S. Sakashita, J. Chromatogr., 511, 89-95(1990).
- 4 3) K. M. Kirkland, K. L. Neilson D. A. McCombs, J. Chromatogr., 545, 43-58(1991).
- 4 4) R. Dappen, H. Arm and V. R. Meyer, J. Chromatogr., 373, 1-20(1986).
- 4 5) R. J. Straka, R. L. Lalonde and I. W. Wainer, Pharm. Res., 5, 187-189(1988).
- 4 6) M. Okamoto and H. Nakagawa, J. Chromatogr., 508, 217-219(1990).

- 4 7) J. Haginaka, C. Seyama, H. Yasuda and K. Takahashi, J. Chromatogr., 598, 67-72(1992).
- 4 8) C. Vandenbosch, D. L. Massart and W. Lindner, Anal. Chim. Acta, 270, 1-12(1992).
- 4 9) J. F. K. Huber, R. van der Linden, E. Ecker and M. Oreans, J. Chromatogr., 83, 267-277(1973).
- 5 0) I. W. Wainer and R. M. Stiffin, J. Chromatogr., 424, 158-162(1988).
- 5 1) Y.-Q. Chu and I. W. Wainer, Pharm. Res., 5, 680-683(1988).
- 5 2) Y.-Q. Chu and I. W. Wainer, J. Chromatogr., 497, 191-200(1989).
- 5 3) I. W. Wainer and Y.-Q. Chu, J. Chromatogr., 455, 316-322(1988).
- 5 4) H. Hagestam and T. C. Pinkerton, Anal. Chem., 57, 1757-1763(1985).
- 5 5) R. E. Majors, LC·GC, 6, 298-302(1988).
- 5 6) G. Schill, I. W. Wainer and S. A. Barkan, 365, 73-88(1986).
- 5 7) S. Andersson and S. Allenmark, J. Liq. Chromatogr., 12, 345-357(1989).
- 5 8) A. Rouchouse, M. Manoha, A. Durand and J. P. Thenot, J. Chromatogr., 506, 601-610(1990).
- 5 9) E. Arvidsson, S. O. Jansson and G. Schill, J. Chromatogr., 506, 579-591(1990).
- 6 0) G. Orn, K. Lahtonen and H. Jalonen, J. Chromatogr., 506, 627-635(1990).
- 6 1) M. Enquist and J. Hermansson, J. Chromatogr., 519, 271-283(1990).
- 6 2) E. Arridsson, S. O. Jansson and G. Schill, J. Chromatogr., 591, 55-63(1992).
- 6 3) B. Herenyi and S. Gorog, J. Chromatogr., 592, 297-299(1992).
- 6 4) S. C. Jacobson and G. Guiochon, Anal. Chem., 64, 1496-1498(1992).
- 6 5) A. M. Rizzi, J. Chromatogr., 513, 195-207(1990).
- 6 6) M. Verzele, M. D. Weerd, C. Dewaele, G. J. Dejong, N. Lammers and F. Spruit, LC·GC, 4, 1162-1177(1986).
- 6 7) S. H. Y. Wong, Clin. Chem., 35, 1293-1298(1989).

- 6 8) F. Belliardo and C. Lucarelli, J. Chromatogr., 535, 305-309(1990).
- 6 9) R. H. Gayden, B. A. Watts III, R. E. Beach and C. R. Benedict, J. Chromatogr., 536, 265-272(1991).
- 7 0) D. Ishii, K. Hibi, K. Asai and M. Nagaya, J. Chromatogr., 152, 341-348(1978).
- 7 1) J. A. Apffel, U. A. Th. Brinkman and R. W. Frei, Chromatographia, 18, 50(1984).
- 7 2) T. Takeuchi, T. Miwa and D. Ishii, J. Chromatogr., 407, 141-150(1987).
- 7 3) T. Takeuchi, Y. Jin and D. Ishii, J. Chromatogr., 321, 159-164(1985).
- 7 4) M. W. F. Nielen, R. C. A. Koordes, R. W. Frei and U. A. Th. Brinkman, J. Chromatogr., 330, 113-119(1985).
- 7 5) M. W. F. Nielen, E. Sol, R. W. Frei and U. A. Th. Brinkman, J. Liq. Chromatogr., 8, 1053-1070(1985).
- 7 6) T. Takeuchi, H. Asai and D. Ishii, J. Chromatogr., 407, 151-158(1987).
- 7 7) J. Vindevogel, J. V. Dijck and M. Verzele, J. Chromatogr., 447, 297-303(1988).
- 7 8) P. G. Baker and J. Goulton, J. Int. Med. Res., 7, 344-350(1979).
- 7 9) G. T. Tucker and M. S. Lennard, Pharmac. Ther., 45, 309-329(1990).
- 8 0) I. Kato, J. Schrode, W. J. Kohr and M. Laskowski Jr., Biochem., 26, 193-201(1987).
- 8 1) B. K. Das, S. K. Agarwal and M. Y. Khan, Biochem. Int., 22, 993-1004(1990).
- 8 2) M. Yagi, A. Shibukawa and T. Nakagawa, Chem. Pharm. Bull., 38, 2513-2517(1990).
- 8 3) L. Schamroth, D. M. Krikler and C. Garrett, Br. Med. J., 11, 660-662(1972).
- 8 4) B. N. Singh, G. Ellrodt and C. T. Peter, Drugs, 15, 169-197(1978).
- 8 5) G. Ellrodt, C. Y. C. Chew and B. N. Singh, Circulation, 62, 669-679(1980).
- 8 6) H. Echizen, T. Brecht, S. Niedergesass, B. Vogelgesang and M. Eichelbaum, Am. Heart J., 109, 210-217(1985).
- 8 7) B. Vogelgesang, H. Echizen, E. Schmidt and M. Eichelbaum, Br. J. Clin. Pharmac., 18, 733-740(1984).
- 8 8) H. Echizen, B. Vogelgesang and M. Eichelbaum, Clin. Pharmacol. Ther.,

- 38, 71-76(1985).
- 8 9) M. Eichelbaum, G. Mikus and B. Vogelgesang, Br. J. Clin. Pharmac., 17, 453-458(1984).
- 9 0) S. R. Harapt and R. E. Kates, J. Chromatogr., 181, 484-489(1980).
- 9 1) S. C. J. Cole, R. J. Flanagan, A. Johnston and D. W. Holt, J. Chromatogr., 218, 621-629(1981).
- 9 2) C. K. Lim, J. M. Rideout and J. W. S. Sheldon, J. Liq. Chromatogr., 6, 887-893(1983).
- 9 3) D. C. Tsilifonis, K. Wilk, R. Reish Jr. and R. E. Daly, J. Liq. Chromatogr., 8, 498-511(1985).
- 9 4) P. A. Kapur, T. Law and E. Watson, J. Chromatogr., 337, 160-165(1985).
- 9 5) M. Kuwada, T. Tateyama and J. Tsutsumi, J. Chromatogr., 222, 507-511(1981).
- 9 6) J. A. Pieper and D. R. Rutledge, J. Chromatogr. Sci., 26, 473-477(1988).
- 9 7) D. E. Drayer, Ther. Drug Monitoring, 10, 1-7(1988).
- 9 8) D. W. Armstrong, T. J. Ward, R. D. Armstrong and T. E. Beesley, Science, 232, 1132-1135(1986).
- 9 9) J. Hasegawa, T. Fujita, Y. Hayashi, K. Iwamoto and J. Watanabe, J. Pharm. Sci., 73, 442-445(1984).
- 1 0 0) M. T. W. Hearn, Adv. J. Chromatogr., 20, 4-82(1982).
- 1 0 1) Z. K. Shihabi, J. Liq. Chromatogr., 11, 1579-1583(1988).
- 1 0 2) T. C. Pinkerton, J. Chromatogr., 20, 4-82(1982).
- 1 0 3) K. Kimata, R. Tsuboi, K. Hosoya, N. Tanaka and T. Araki, J. Chromatogr., 515, 73-84(1990).
- 1 0 4) D. J. Gisch, B. T. Hunter and B. Feibush, J. Chromatogr., 433, 264-268(1988).
- 1 0 5) B. Feibush and C. T. Santasania, J. Chromatogr., 544, 41-49(1991).
- 1 0 6) W. Buchberger, H. Malissa and E. Mulleder, J. Chromatogr., 602, 51-55(1992).

- 1 0 7) J. Haginaka, J. Wakai and H. Yasuda, *J. Chromatogr.*, 535, 163-172(1990).
- 1 0 8) J. Haginaka and J. Wakai, *Anal. Sci.*, 8, 141-144(1992).
- 1 0 9) D. E. Williams and P. M. Kabra, *Anal. Chem.*, 62, 807-810(1990).
- 1 1 0) H. Yoshida, I. Morita, T. Masujima and H. Imai, *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 2297-2290(1982).
- 1 1 1) G. Tamai, H. Yoshida and H. Imai, *J. Chromatogr.*, 423, 147-153(1987).
- 1 1 2) J. Haginaka and J. Wakai, *Anal. Chem.*, 62, 997-1000(1990).
- 1 1 3) A. M. Stalcup and K. L. Williams, *J. Liq. Chromatogr.*, 15, 29-37(1992).
- 1 1 4) L. Stevens, *Comp. Biochem. Physiol.*, 100, 1-9(1991).
- 1 1 5) N. M. Green, *Biochem. J.*, 89, 585-591(1963).
- 1 1 6) T. Miwa, T. Miyakawa and Y. Miyake, *J. Chromatogr.*, 457, 227-233(1988).
- 1 1 7) R. J. Delange and T.-S. Huang, *J. Biol. Chem.*, 246, 698-709(1971).
- 1 1 8) A. J. Lomant and G. Fairbanks, *J. Mol. Biol.*, 104, 243-261(1976).
- 1 1 9) P. S. R. Anjaneyula and J. V. Staros, *Int. J. Pep. Pro. Res.*, 30, 117-124(1987).
- 1 2 0) P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, 245, 3059-3065(1970).
- 1 2 1) M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254(1976).
- 1 2 2) J. Haginaka, N. Yasuda, J. Wakai, H. Matsunaga, H. Yasuda and Y. Kimura, *Anal. Chem.*, 61, 2445-2448(1989).
- 1 2 3) S. Andersson, S. Allenmark, P. Erlandsson and S. Nilsson, *J. Chromatogr.*, 498, 81-91(1990).
- 1 2 4) S. Andersson, R. A. Thompson and S. G. Allenmark, *J. Chromatogr.*, 591, 65-73(1992).
- 1 2 5) Y. Yamanishi, S. Araki, T. Kosasa, H. Ogura and K. Yamatsu, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 14, 59(1988).
- 1 2 6) J. Iredale, A.-F. Aubry and I. W. Wainer, *Chromatographia*, 31, 329-334(1991).

- 1 2 7) I. Marle, P. Erlandsson, L. Hansson, R. Isaksson, C. Pettersson and G. Pettersson, *J. Chromatogr.*, 586, 233-248(1991).
- 1 2 8) A.-F. Aubry, F. Gimenez, R. Farinotti and I. W. Wainer, *Chirality*, 4, 30-35(1992).
- 1 2 9) I. Marle, A. Karlsson and C. Pettersson, *J. Chromatogr.*, 604, 185-196(1992).
- 1 3 0) N. Mano, Y. Oda, N. Asakawa, Y. Yoshida, T. Sato and T. Miwa, *J. Chromatogr.*, 623, 221-228(1992).
- 1 3 1) N. M. Green and E. J. Toms, *Biochem. J.*, 133, 687-700(1973).
- 1 3 2) B. K. Das, S. K. Agarwal and M. Khan, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1076, 343-350(1991).
- 1 3 3) S. Shaltiel, *Methods Enzymol.*, 104, 69-96(1984).
- 1 3 4) K. Fretheim, B. Egelanddal and O. Harbitz, *Int. J. Pep. Pro. Res.*, 25, 601-607(1985).
- 1 3 5) X.-M. Lu, A. Figueroa and B. L. Karger, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 1978-1979(1988).
- 1 3 6) S. Hjerten, *Methods Biochem. Anal.*, 27, 89-108(1981).
- 1 3 7) J. G. Beeley, *Biochem. J.*, 159, 335-345(1976).
- 1 3 8) E. Fredericq and H. F. Deutsh, *J. Biol. Chem.*, 181, 499(1949).
- 1 3 9) N. M. Green, *Adv. Pro. Chem.*, 29, 85-133(1975).
- 1 4 0) N. Mano, Y. Oda, T. Miwa, N. Asakawa, Y. Yoshida and T. Sato, *J. Chromatogr.*, 603, 105-109(1992).
- 1 4 1) N. M. Green, *Biochem. J.*, 89, 599-609(1963).
- 1 4 2) M. Enquist and J. Hermansson, *J. Chromatogr.*, 519, 285-298(1990).
- 1 4 3) D. C. Kvam, E. H. Banitt and J. R. Schmid, *Am. J. Cardiol.*, 53, 22-25(1984).
- 1 4 4) H. Nii, *Jpn. J. Electrocardiol.*, 7, 619(1987).
- 1 4 5) Y. Yamanishi, H. Ogura, T. Kosasa, K. Uchikoshi, Y. Sawa and K. Yamatsu, *Eur. J. Pharmacol.*, 183, 1935(1990).

- 1 4 6) T. Kosasa, Y. Yamanishi, H. Ogura and K. Yamatsu, *Eur. J. Pharmacol.*, 183, 1936(1990).
- 1 4 7) D. Westerlund, *Chromatographia*, 24, 155-164(1987).
- 1 4 8) J. V. Posluszny and R. Weinberger, *Anal. Chem.*, 60, 1953-1958(1988).
- 1 4 9) M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliott, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *Anal. Chem.* 54, 645A-657A(1982).
- 1 5 0) P. A. Blau, J. W. Hines and R. D. Voyksner, *J. Chromatogr.*, 420, 1-12(1987).
- 1 5 1) L.-E. Edholm, C. Lindberg, J. Paulson and A. Walhagen, *J. Chromatogr.*, 424, 61-72(1988).
- 1 5 2) A. Walhagen, L.-E. Edholm, C. E. M. Heeremans, R. A. M. van der Hoeven, W. M. A. Niessen, U. R. Tjaden and J. van der Greef, *J. Chromatogr.*, 474, 257-263(1989).
- 1 5 3) C. Lindberg, J. Paulson and A. Blomqvist, *J. Chromatogr.*, 554, 215-226(1991).
- 1 5 4) J. J. Conboy and J. Henion, *Biological Mass Spectrom.*, 21, 397-407(1992).
- 1 5 5) E. van Bakergem, R. A. M. van der Hoeven, W. M. A. Niessen, U. R. Tjaden, J. van der Greef, G. K. Poon and R. McCague, *J. Chromatogr.*, 598, 189-194(1992).
- 1 5 6) J. van der Greef, W. M. A. Niessen and U. R. Tjaden, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 6, 565-571(1988).
- 1 5 7) N. Asakawa, H. Ohe, M. Tsuno, Y. Nezu, Y. Yoshida and T. Sato, *J. Chromatogr.*, 541, 231-241(1991).
- 1 5 8) S. Pleasance, P. Thibault, M. A. Moseley, L. J. Deterding, K. B. Tomer and J. W. Jorgenson, *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, 1, 312-319(1990).
- 1 5 9) Y. Ito, T. Takeuchi, D. Ishii and M. Goto, *J. Chromatogr.*, 346, 161-166(1985).